



TÓPICOS SELECTOS EN BIODIVERSIDAD Y BIOTECNOLOGÍA

TÓPICOS SELECTOS EN BIODIVERSIDAD Y BIOTECNOLOGÍA

Corina M. Berón
Fernanda Covacevich
Leonardo Curatti
Graciela L. Salerno
Editores

INBIOTEC
CONICET

UNIVERSIDAD NACIONAL
DE MAR DEL PLATA

FIBA
FUNDACIÓN PARA
INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS APLICADAS



978-987-544-623-6





TÓPICOS SELECTOS EN BIODIVERSIDAD Y BIOTECNOLOGÍA

Corina M. Berón
Fernanda Covacevich
Leonardo Curatti
Graciela L. Salerno
Editores

INBIOTEC

CONICET


UNIVERSIDAD NACIONAL
DE MAR DEL PLATA


FIBA
FUNDACIÓN PARA
INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS APLICADAS





Tópicos Selectos en Biodiversidad y Biotecnología /

Anabella Aguilera ... [et. al.] ; edición literaria a cargo de Corina M. Berón ...
[et.al.]. – 1ª ed. – Mar del Plata: Universidad Nacional de Mar del Plata, 2014.
190 p. ; 21x15 cm.

ISBN 978-987-544-623-6

1. Biodiversidad. 2. Biotecnología. I. Aguilera, Anabella II. Berón, Corina M.,
ed. lit. CDD 660.6

Fecha de catalogación: 15/12/2014

Tópicos Selectos en Biodiversidad y Biotecnología

Primera edición

©Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas
Vieytes 3103
CP 7600 - Mar del Plata, Argentina
www.fiba.org.ar

Foto de tapa: Tomada el 3/12/2013, en viaje de campaña de SA Stenglein,
E Castañares y MI Dinolfo, entre Cnel. Suárez y Pigüé, provincia de Buenos
Aires, Argentina.

Diseño: SP

Reservados los derechos de reproducción total o parcial, mediante cualquier
medio electrónico o mecánico.





ÍNDICE

PREFACIO	vii
1: MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA	1
Capítulo 1: Hongos y bacterias del suelo con capacidades biofertilizantes y biocontroladoras para su aplicación con fines biotecnológicos. <i>V. Fabiana Consolo, Keren Hernandez Guijarro, A. Julieta Thougnon Islas, Fernanda Covacevich</i>	3
Capítulo 2: Comunidades fúngicas del suelo: impacto en la sustentabilidad de los cultivos extensivos en regiones templadas. <i>Luciana Belén Silvestro, Cristina Soledad Merlos, Germán Pacheco, Fernando Biganzolli, Horacio Forján, Lucrecia Manso, Sebastián Pelizza, María Virginia Moreno</i>	15
Capítulo 3: Análisis de hongos de interés en sistemas agro-alimentarios. <i>Eliana Castañares, María Inés Dinolfo, María Soledad Nogueira, Mauro Martínez, Walter Pacheco, Sebastián Stenglein</i>	25
Capítulo 4: Control de insectos plaga de importancia agrícola por medio de <i>Bacillus thuringiensis</i> . <i>Corina M. Berón, Graciela L. Salerno</i>	35





2: BIOTECNOLOGÍA VEGETAL 45

Capítulo 5: Análisis y generación de variabilidad genética en alpiste (*Phalaris canariensis* L.) a través del uso de herramientas biotecnológicas. 47

Maximiliano Cogliatti

Capítulo 6: Caracterización genotípica, fenotípica y metabolómica de calidad, rendimiento y adaptación en trigo asociado al cambio climático. 59

Silvana Marisol Luján Basile, María Cecilia Peverelli, Horacio Dalla Valle, Jorge A. Tognetti, William John Rogers

Capítulo 7: Mecanismos de respuesta a estreses ambientales: en busca del aumento de la productividad de cultivos de interés agronómico. 73

Giselle Martínez Noël, Leandra Lechner, María Victoria Martín, Néstor Aznar, Graciela L. Salerno

Capítulo 8: Estudios de poblaciones de hongos fitopatógenos y su interacción con plantas de importancia agronómica. 83

Verónica Fabiana Consolo, Laura E. Giarrocco, Graciela L. Salerno

3: ENTOMOLOGÍA APLICADA 97

Capítulo 9: Control biológico de poblaciones de mosquitos de importancia sanitaria. 99

Leonardo M. Díaz-Nieto, Rocio de la Paz Lopez, Corina M. Berón

Capítulo 10: Biodiversidad de los insectos de suelo de áreas protegidas y agroecosistemas de la provincia de Buenos Aires y su utilización como herramientas de gestión y manejo. 111

Armando C. Cicchino, Darío P. Porrini, Adela V. Castro, Juan M. Arcusa, Diego L. Carpintero, Juan L. Farina





4: BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL 127

Capítulo 11: Las floraciones de cianobacterias toxígenas y su impacto en la calidad del agua para consumo y recreación 129

*María de los Ángeles Kolman, Anabella Aguilera,
María Victoria Martín, Graciela L. Salerno*

Capítulo 12: Uso de técnicas moleculares para el estudio de la biodiversidad de las fracciones más pequeñas del fitoplancton del Mar Argentino. 143

*Macarena Pérez-Cenci, Gonzalo E. Caló, Dana Scheidegger,
Graciela L. Salerno*

5: BIOTECNOLOGÍA ALGAL 155

Capítulo 13: Desarrollos de biotecnología algal como alternativa sustentable para la producción de biocombustibles y otros productos naturales. 157

Mauro Do Nascimento, Lara Sánchez Rizza, Leonardo Curatti

Capítulo 14: Fijación biológica del nitrógeno como estrategia alternativa a la producción industrial de fertilizantes nitrogenados. 167

*Juan César Federico Ortiz Márquez, Andrés Arruebarrena Di Palma,
Rafael Ambrosio, Joaquín Inchaurredo, Leonardo Curatti*







PREFACIO

La Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA) es un organismo privado de bien público que se estableció legalmente en 1979 por iniciativa de científicos y empresarios argentinos que deseaban crear una institución dedicada a la enseñanza y la investigación científica en Ciencias Biológicas. El Dr. Luis F. Leloir fue uno de sus miembros fundadores y su primer presidente. La Fundación surgió con la misión de generar y difundir actividad intelectual creativa, promoviendo la realización de proyectos de investigación científica en los campos de la biología funcional de plantas y microorganismos, y sus aplicaciones tecnológicas. En particular, desde hace más de una década, ante la necesidad de brindar soluciones novedosas a las problemáticas generadas por la creciente demanda de alimentos, el agotamiento de las reservas energéticas y el deterioro del medioambiente, la Fundación se sumó al desafío de científicos y tecnólogos, enfocando sus actividades hacia aquellas problemáticas. Los proyectos iniciados hace varios años, están en sintonía con las nuevas tendencias en materia de investigación y desarrollo, hacia tecnologías alternativas en general, y referidas a la agricultura, al manejo integrado de insectos plaga, al cambio climático y al sector energético, que implican desarrollos sostenibles teniendo en consideración la protección del medio ambiente.

La Biología Aplicada, como la denominó Leloir en la creación de la FIBA, es sinónimo de Biotecnología, y su estrecha relación con los seres vivos y su diversidad es indiscutible. La importancia de la Biodiversidad como un recurso natural patrimonio de la Humanidad, reconocida a nivel mundial en el Convenio sobre Diversidad Biológica (1992) y su enorme potencial biotecnológico, llevaron a que la FIBA creara en el año 2007 el **Centro de Estudios**





de **Biodiversidad y Biotecnología de Mar del Plata (CEBB-MdP)**, que se convirtió en un Grupo Vinculado a la Unidad Ejecutora N° 12521, del CONICET. El CEBB-MdP incluía investigadores, becarios y técnicos del CONICET que tenían lugar de trabajo en la sede del Centro de Investigaciones Biológicas de la FIBA en Mar del Plata y en el Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB-Azul), de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA). Ambos centros de investigación venían desarrollando proyectos en colaboración, con un enfoque interdisciplinario alrededor de problemas comunes. En el año 2012, el CEBB-MdP de la FIBA dio lugar a la constitución de una nueva Unidad Ejecutora del CONICET, denominada **Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC)**, que incorporó nuevos investigadores, provenientes de la EEA-INTA-Balcarce y del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Mar del Plata (GENEBSO).

La estrecha relación del estudio de la **Biodiversidad** y de sus aplicaciones tecnológicas, fue ya vislumbrada en el “Convenio sobre la Diversidad Biológica” (CDB, NU, 1992). El CDB define a la Biodiversidad como “la variabilidad de organismos vivos provenientes de toda clase de fuentes entre las que se incluyen los ecosistemas terrestres y marinos, ecosistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los que forman parte; y comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas”. A su vez, dicho convenio reconoció otros valores, tales como ecológicos, genéticos, sociales, económicos, científicos, educativos, culturales, recreativos y estéticos, y declaró la importancia de la diversidad biológica para la evolución y para el mantenimiento de los sistemas necesarios para la vida de la biosfera. Por otro lado, la **Biotecnología** comprende las aplicaciones tecnológicas que utilicen sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos, en general, para el beneficio humano. En este sentido es su objetivo aprovechar la maquinaria biológica para generar productos que aporten soluciones o mejoras tanto en el campo agropecuario, de la salud humana, de la industria alimenticias, química, de materiales, entre otras, como en la provisión de fuentes de energía de mayor calidad y/o productividad, y en la remediación del medioambiente. Surge claramente el gran potencial que posee la Biodiversidad inexplorada como materia prima para desarrollos biotecnológicos innovadores y/o superadores de los actuales. Este





concepto ha dado origen a una diversidad de programas de bioprospección de la biota a nivel internacional. Asimismo, la Biotecnología desarrolla y utiliza herramientas que resultan sumamente útiles para la bioprospección, domesticación, conservación y catalogación molecular de los especímenes. Es así que los avances biotecnológicos son claves para la apreciación y conservación de la Biodiversidad, como así también para la evaluación y control del deterioro ambiental, a través de estudios de cambios en la Biodiversidad.

La FIBA y el INBIOTEC-CONICET, en un esfuerzo conjunto, revalorizan el significado de la Biodiversidad asociada a la Biotecnología, promoviendo la publicación de este primer volumen de **“Tópicos selectos en Biodiversidad y Biotecnología”**, donde se presentan algunos de los avances más recientes de los proyectos de los grupos de investigación provenientes del CEBB-MdP de la FIBA y su continuación como INBIOTEC.

El texto ha sido organizado en cinco secciones con los capítulos específicos de las líneas de investigación actuales.

La **Sección de Microbiología Agrícola** reúne capítulos que comentan avances recientes en estudios de Biodiversidad de microorganismos como indicadores de calidad agronómica del suelo y del impacto de distintas prácticas de labranza, estudios de prospección de microorganismos capaces de reemplazar parcial o totalmente determinados agroquímicos, microorganismos promotores del crecimiento de cultivos, e ingeniería genética de microorganismos fijadores de nitrógeno, como biofertilizantes alternativos.

La **Sección Biotecnología Vegetal** presenta capítulos referidos al uso de técnicas de la biología molecular aplicadas al mejoramiento de cultivos de interés y estudios bioquímicos, fisiológicos y moleculares para entender las bases de la productividad y la tolerancia a estreses ambientales.

Los capítulos de la **Sección de Entomología Aplicada** describen la Biodiversidad local de insectos de interés en salud pública, agricultura y monitoreo de calidad ambiental, y los agrupados en la **Sección de Biotecnología Ambiental** comentan contribuciones más específicamente relacionadas con la biodiversidad, el monitoreo ambiental y su posible relación con el cambio climático global y la dinámica de poblaciones de cianobacterias en relación a la calidad del agua potable y recreacional.

En la última **Sección de Biotecnología Algal** se comentan avances recientes en la prospección de microalgas de la región con potencial para la producción de biocombustibles, fertilizantes y biomateriales en forma sustentable.





Finalmente, queremos hacer llegar nuestro profundo agradecimiento a los autores de los capítulos, que hicieron posible la concreción del libro, por su dedicación y esmero en la redacción y selección de imágenes, para llegar a un amplio espectro de lectores.

Los Editores

12 de noviembre de 2014





1:

MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA







CAPÍTULO 1

Hongos y bacterias del suelo con capacidades biofertilizantes y biocontroladoras para su aplicación con fines biotecnológicos

V. Fabiana Consolo¹, Keren Hernandez Guijarro²,
A. Julieta Thougnon Islas^{2,3}, Fernanda Covacevich^{1,2}

¹Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC-CONICET),
y Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), Mar del Plata, Argentina.

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), UI INTA-FCA, Balcarce

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)

faconsolo@fiba.org.ar

RESUMEN

La provincia de Buenos Aires representa un área agrícola por excelencia en nuestro país debido a sus características edáficas y climáticas, adecuadas para la producción de cultivos. Sin embargo, como consecuencia de la explotación intensiva del suelo en las últimas décadas con permanente extracción de nutrientes, se han evidenciado pérdidas de materia orgánica con los consecuentes desbalances de nutrientes claves para la producción agropecuaria. Por esta razón, la fertilización (destinada a la reposición de nutrientes) y la utilización de la siembra directa (para minimizar las pérdidas de materia orgánica) se han implementado de manera generalizada en nuestro país. Sin embargo, la mayor incidencia de enfermedades fúngicas (asociada a la siembra directa) ha generado mayor dependencia en el uso de pesticidas. Tanto la aplicación de fertilizantes





como de pesticidas puede afectar negativamente las poblaciones microbianas del suelo que podrían a su vez contribuir a reducir el uso de agroquímicos y fertilizantes sintéticos. Sin embargo, estos aspectos no siempre son considerados al planificar emprendimientos productivos.

Nuestro grupo de trabajo tiene como blanco de estudio los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA; reconocidos por incrementar la nutrición vegetal, la capacidad de recuperación de las plantas frente a estrés y por incrementar la estabilidad de los agregados del suelo), hongos del género *Trichoderma* (reconocidos como agentes de control biológico contra hongos patógenos, solubilizadores de fósforo (P) y productores de factores de promoción del crecimiento vegetal) y microorganismos solubilizadores de P. Nuestra línea de investigación tiene como objetivos: a) aislar, multiplicar y caracterizar HMA, *Trichoderma* y solubilizadores de P nativos de la Provincia de Buenos Aires; b) testear la potencialidad de los grupos seleccionados como potenciales promotores de crecimiento (biofertilizantes y biocontroladores) de cultivos de importancia agrícola; y c) formular biofertilizantes compuestos de consorcios microbianos nativos de la Provincia de Buenos Aires.

En el presente se están ensayando diferentes combinaciones de consorcios microbianos con el objetivo de ser utilizados como herramientas dentro de programas de manejo integrado de nutrición y control de enfermedades fúngicas en cultivos de importancia agronómica. Además, se está generando una colección de microorganismos nativos de la Provincia de Buenos Aires que han evidenciado, bajo condiciones controladas, capacidades promotoras de crecimiento en plantas de maíz, trigo, cebada y tomate. Dichos microorganismos están siendo caracterizados en su actividad y diversidad genética, con el objetivo de ser utilizados como bioinoculantes.





INTRODUCCIÓN

La explotación intensiva del suelo de la agricultura convencional (de alto insumo) de las últimas décadas en Argentina, con permanente extracción de nutrientes, aceleró su degradación y afectó su fertilidad natural, y está poniendo en peligro su productividad y sostenibilidad. La materia orgánica constituye gran parte del reservorio de nutrientes del suelo. Sin embargo, se han registrado importantes pérdidas de materia orgánica asociadas al uso intensivo del suelo. En consecuencia, los suelos de la Provincia de Buenos Aires están evidenciando desbalances de nutrientes claves en la producción agropecuaria tales como fósforo (P) y zinc, entre otros [1]. En este sentido, si bien la fertilización química es una práctica generalizada, no siempre cubre los requerimientos de los cultivos. A efectos de minimizar las pérdidas en materia orgánica, en las últimas décadas la siembra directa (SD) se ha implementado y extendido en aproximadamente un 75% del total de la superficie sembrada en nuestro país (www.aapresid.org.ar). Debido a que la mayor disponibilidad de residuos incrementa la humedad del suelo, en la mayoría de los casos la SD está asociada a mayor incidencia de enfermedades fúngicas lo que ha generado además importante dependencia en el uso de pesticidas.

Los microorganismos del suelo que cumplen funciones claves en el ciclado de nutrientes, en el mantenimiento del equilibrio microbiológico, en la resiliencia del sistema edáfico y consecuentemente en la productividad vegetal, están evidenciando cumplir roles protagónicos en el sustento de la integridad de los sistemas terrestres. Sin embargo, ha sido demostrado que tanto la aplicación de fertilizantes como de pesticidas puede afectar negativamente las poblaciones microbianas del suelo que podrían a su vez contribuir a reducir el uso de agroquímicos y fertilizantes sintéticos [2, 3]. Paradójicamente, estos aspectos no siempre son considerados al planificar emprendimientos productivos.

La pérdida de biodiversidad microbiana ha sido identificada como la principal amenaza para el mantenimiento del equilibrio en los ciclos biogeoquímicos del suelo. Sin embargo, el rol de los microorganismos en la capacidad de resiliencia del suelo así como los mecanismos involucrados permanecen aún no bien clarificados. Ha sido reportado que el manejo agrícola puede afectar las capacidades microbianas. Sin embargo, no siempre los resultados evidencian las mismas respuestas de actividad o diversidad microbiana asociadas a disturbios en el sistema suelo [4].





En nuestro país la diversidad microbiana edáfica está comenzando a ser explorada en su potencialidad como fuente de bioinoculantes. El primer paso es disponer de colecciones de microorganismos nativos aislados, seleccionados, caracterizados en sus capacidades biofertilizantes o bioprotectoras para luego ser multiplicados, conservados y utilizados para la formulación de inoculantes biológicos. En tal sentido, las técnicas bioquímicas y moleculares constituyen herramientas muy eficientes para caracterizar poblaciones microbianas.

Tres grandes grupos de microorganismos del suelo presentan características para ser utilizados como inoculantes biológicos solos o asociados, y son el centro de estudio de nuestro grupo de investigación. Uno de ellos lo constituyen los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) (Fig. 1) que establecen relaciones simbióticas mutualistas al colonizar las raíces del 90% de las plantas terrestres. Los HMA son reconocidos por mejorar la nutrición vegetal, absorción de agua y funciones metabólicas, incrementar la resistencia o recuperación de las plantas frente a situaciones de estrés y contribuir a la estabilidad de los agregados del suelo [5]. Otro grupo de hongos de vida libre, constituido por representantes del género *Trichoderma* (Fig. 2A) pueden actuar como agentes de control biológico contra hongos patógenos, son capaces de solubilizar nutrientes del suelo y producir factores que contribuyen a la promoción del crecimiento vegetal [6]. Asimismo, otro grupo funcional que ha recibido la atención de nuestras investigaciones por las interacciones sinérgicas que pueden establecer con los HMA y *Trichoderma*, lo constituyen microorganismos con capacidad de convertir formas insolubles del P en formas solubles y accesibles por las plantas [7].

En la búsqueda de alternativas tendientes a favorecer la producción agrícola sostenible con el ambiente edáfico, estamos explorando cómo las características edáficas, resultado del manejo, afectan las poblaciones HMA, *Trichoderma* y solubilizadores de P nativos de la región. Además, consorcios o grupos individuales con capacidades promisorias están siendo testeados, solos o combinados, como posibles promotores de crecimiento vegetal en plantas de importancia agrícola.

RESULTADOS DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Se ha evidenciado que la capacidad de formar micorrizas de consorcios microbianos nativos de la Provincia de Buenos Aires es afectada negativamente



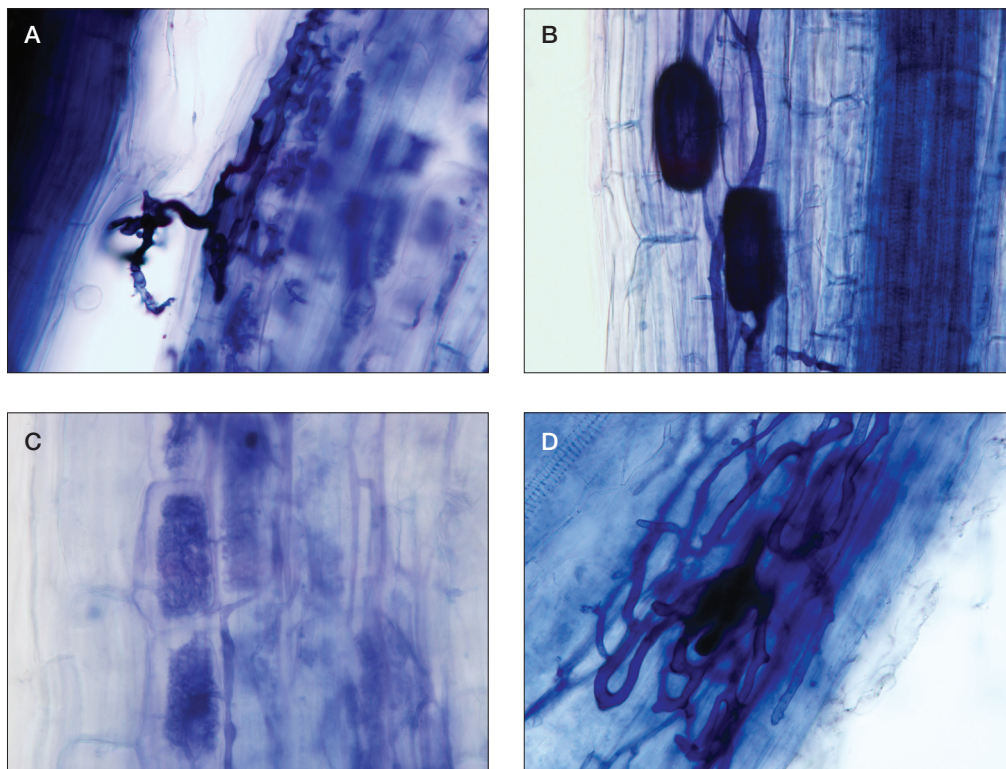


Figura 1. Estructuras de colonización radical por Hongos formadores de Micorrizas Arbusculares (HMA) nativos de la Provincia de Buenos Aires.

A) Hifa de HMA ingresando en raíz de girasol, con formación de arbúsculos (40X).

B) Colonización de raíz de raigrás (*Lolium multiflorum* Lam.) por HMA, con formación de vesículas (40X).

C-D) Diferentes tipos de colonización por HMA en raíces (C: tipo *arum*, con formación de arbúsculos en maíz) y de girasol (D: tipo *paris* con formación de enrollamientos denominados 'coils' en girasol) (40X).



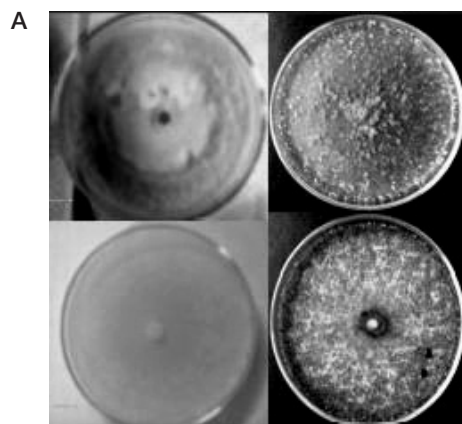
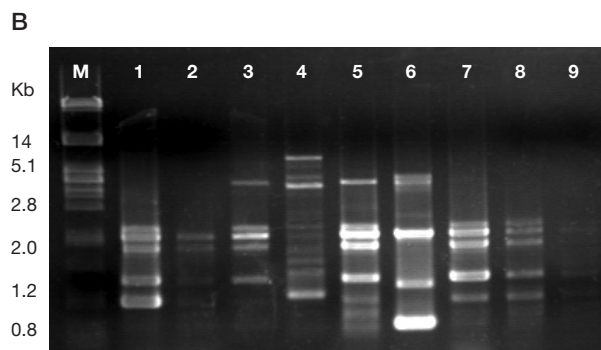


Figura 2. Morfología y patrones obtenidos por ISSR de cepas de *Trichoderma harzianum*.

A) Variación morfológica de cuatro cepas nativas de *T. harzianum* crecidas en medio de cultivo APG .

B) Patrones de amplificación de nueve aislamientos de *T. harzianum* utilizando la técnica de ISSR. M, marcador de peso molecular λ PstI (DNA del fago Lambda digerido con la enzima PstI)



por elevados contenidos de nutrientes tales como P y hierro [8]. En la mayoría de los casos la fertilización, particularmente proveniente de fuentes sintéticas y a dosis elevadas, afecta negativamente la capacidad colonizadora de los HMA nativos de la región [3, 9].

A partir de consorcios que evidenciaron elevada capacidad de colonización radical por HMA, se está evaluando su potencialidad promotora del crecimen-





to vegetal. La inoculación con consorcios microbianos (con HMA) nativos de lotes bajo manejo agrícola de Lobería mostró respuesta positiva temprana (incremento de crecimiento a las dos semanas) en plantas de maíz y tomate [10]. Consorcios microbianos con HMA nativos de lotes bajo manejo agrícola de Balcarce incrementaron el crecimiento y absorción de zinc en plantas de maíz en el período vegetativo V6 [3]. La inoculación combinada de solubilizadores de P nativos de Balcarce de lotes bajo SD con consorcios microbianos con HMA nativos de lotes prístinos de Tandil también incrementó el crecimiento de plantas de trigo en preantesis. Sin embargo, los mayores incrementos se lograron por la inoculación individual con los solubilizadores de P y no se evidenció efecto sinérgico por la inoculación combinada. Los resultados indicarían que más que el manejo, la zona geográfica, las características edáficas y la capacidad micotrófica permitirían seleccionar consorcios microbianos con HMA potencialmente promotores de crecimiento vegetal.

Por otra parte, se ha evidenciado que cepas de *Trichoderma* productoras de ácido indol acético y capaces de solubilizar P inorgánico en condiciones *in vitro*, mostraron ser potencialmente promotoras del crecimiento vegetal en estadios tempranos sobre plantas de arroz y soja.

Si bien se cuenta con un cepario de más de 100 cepas de *Trichoderma* aisladas de diferentes regiones agrícolas del país, actualmente nos hemos centrado en el relevamiento de cepas nativas de regiones bajo cultivo y prístinas de la Provincia de Buenos Aires. En este contexto se han aislado 30 cepas de *Trichoderma*, los cuales provienen mayoritariamente de la zona del sudeste bonaerense (73%), que fueron identificadas como *T. koningii*, *T. gamsii*, *T. harzianum*, siendo esta última la especie más abundante (93%). Las cepas más eficientes presentaron valores de eficiencia relativa de solubilización de P del 275%. Además, se evidenció elevada capacidad micotrófica (mayor al 50%) en consorcios microbianos multiplicados durante 6 meses provenientes de suelos del norte, centro y sudeste de la Provincia. En general, la mayor capacidad micotrófica provino de los consorcios nativos de sitios prístinos. Bajo estas últimas condiciones siempre se aislaron cepas de *Trichoderma* y la capacidad micotrófica fue en general la más elevada. Los consorcios microbianos provenientes de lotes bajo manejo agrícola mostraron, en general, menor capacidad micotrófica por HMA que los consorcios provenientes de suelos prístinos; y en ocasiones no se aislaron cepas de *Trichoderma* en los consorcios provenientes de manejo agrícola. Se evidenciaron asociaciones negativas entre la capacidad micotrófica





de HMA, la abundancia de solubilizadores de P y de hongos *Trichoderma* con el contenido de P, hierro, materia orgánica y el pH de los suelos. Cepas individuales de *Trichoderma* y solubilizadores de P con capacidades promisorias, combinadas con consorcios de HMA con capacidad micotrófica del 60% han ocasionado incrementos en el crecimiento de plantas de cebada.

DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS GRUPOS BLANCO DE ESTUDIO

Se están realizando relevamientos regionales en la Provincia de Buenos Aires y analizando la diversidad genética de HMA mediante *Single Stranded Conformation Polymorphism* (SSCP). Esta estrategia permite determinar por electroforesis no desnaturalizante diferencias en la secuencia genética de nucleótidos entre cadenas simples y ha demostrado ser eficiente en detectar diferencias entre HMA mediante la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una región de la subunidad ribosomal mayor (DNaR 28S) [11]. Utilizando esta estrategia hemos detectado diferencias genéticas entre especies de hongos las cuales estuvieron estrechamente relacionadas a la región de muestreo más que al manejo agrícola.

A partir de patrones moleculares de SSCP hemos detectado elevada diversidad para HMA nativos de la Provincia de Buenos Aires. El corte de bandas con su subsiguiente reamplificación y secuenciación ha confirmado la presencia de HMA en el perfil, y las secuencias están siendo depositadas en bases públicas (NCBI; números de acceso KJ920202.1 y KM262654 a KM262657). El análisis de Máxima Parsimonia permitió agrupar las secuencias obtenidas a partir de las bandas junto a representantes de HMA del género *Glomus* (coincidentemente con los cebadores utilizados para la reacción de PCR) y las separó de otros géneros de HMA (*Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*). Además, con los patrones de SSCP obtenidos se realizaron dendrogramas de similitud (Fig. 3) y se analizó el reagrupamiento en Clusters de acuerdo a regiones, manejo o características químicas de los suelos. La técnica de SSCP también está siendo utilizada para la caracterización de la biodiversidad de cepas de *Trichoderma* de suelos de la Provincia de Buenos Aires. Además la variabilidad genética de *Trichoderma* también es analizada mediante otras técnicas (Fig. 2B) como UP-PCR e ISSR [12].



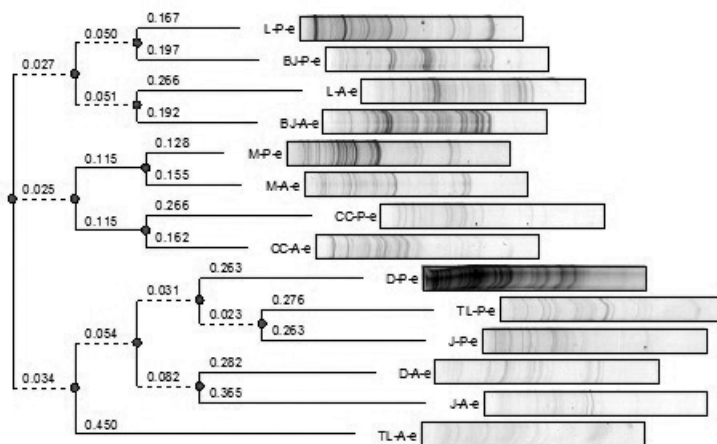


Figura 3. Dendrograma Neighbor-Joining basado en los patrones de bandas obtenidos por análisis PCR-SSCP a partir de DNA de esporas de HMA.

Detalle de siglas en dendrograma: Primeras letras indican localidades: Benito Juárez (BJ), Carlos Casares (CC), Coronel Dorrego (CD), Junín (J), Lobería (L), Madariaga (M) y Trenque Lauquen (TL). Letra intermedia indica manejo: agrícola (A) y prístino (P). Última letra en minúscula indica origen del DNA: esporas (e).

POTENCIALIDADES DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Nuestra línea de trabajo es pionera en integrar estudios tendientes a evaluar la potencialidad de la aplicación individual o combinada de HMA, *Trichoderma* y solubilizadores de P para favorecer la nutrición mineral, el crecimiento y/o sanidad de cultivos de importancia en la producción agrícola de nuestro país. En este sentido, estamos evidenciando las capacidades promotoras de crecimiento vegetal de estos microorganismos que forman parte de la microbiota edáfica nativa de la Provincia de Buenos Aires. Mediante estudios de microbiología clásica, biología molecular y ensayos de inoculación estamos contribuyendo a la caracterización, selección, multiplicación, detección y conservación de estos microorganismos. Nuestros estudios constituyen el primer paso para la





selección de estos organismos potencialmente benéficos para que en un futuro puedan formar parte de bioinoculantes.

OFERTA TECNOLÓGICA

La formulación de bioproductos conformados con microorganismos del suelo nativos de la Provincia de Buenos Aires, quienes solos o combinados incrementen el rendimiento y la calidad de cultivos de importancia agronómica atendiendo a la sostenibilidad de los agroecosistemas, resulta un objetivo estratégico y pionero para nuestro país. Las metodologías moleculares de detección de los microorganismos y su diversidad que estamos empleando, podrían ser utilizadas para monitorear la persistencia de los organismos utilizados como biofertilizantes en el suelo inoculado. Esto permitirá vincular la información tecnológica con la generación de inoculantes con probada instalación y persistencia, que puedan ser fácilmente transferidos a técnicos y agricultores dedicados a la producción de cultivos de importancia económica del país





REFERENCIAS

1. Sainz Rozas HR, Echeverría HE, Calviño PA, Barbieri PA, Redolatti M (2003) Respuesta del Trigo al agregado de Zinc y Cobre en suelos del Sudeste Bonaerense. *Ciencia del Suelo* 21(2):52-58.
2. Marshall CB, McLaren JR, Turkington R (2011) Soil microbial communities resistant to changes in plant functional group composition. *Soil Biol Biochem* 43(1):78-85.
3. Astiz Imaz P, Barbieri PA, Echeverría HE, Sainz Rozas HR, Covacevich F (2014) Indigenous mycorrhizal fungi from Argentina increase Zn nutrition of maize modulated by Zn fertilization. *Soil and Env* 31(1):23-32.
4. Griffiths BS, Philippot L (2013) Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiol Rev* 37(2):112-129.
5. Siddiqui ZA, Akhtar MS, Futai K (eds) (2008) Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry. Springer, New Delhi
6. Samuels GJ (1996) *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. *Mycol Res* 100 (8):923-935.
7. Adesemoye AO, Kloepper JW (2009) Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* 85(1):1-12.
8. Covacevich F, Eyherabide M, Sainz Rozas HR, Echeverría HE (2012) Capacidad micotrófica arbuscular y características químicas de suelos agrícolas y prístinos de Buenos Aires (Argentina). *Ciencia del Suelo* 30(2):119-128.
9. Covacevich F, Marino MA, Echeverría HE (2006) The phosphorus source determines the arbuscular mycorrhizal potential and the native mycorrhizal colonization of tall fescue and wheatgrass in a moderately acidic Argentinean soil. *Eur J Soil Biol* 42(3):127-138.
10. Thougnon Islas AJ, Eyherabide M, Echeverría HE, Sainz Rozas HR, Covacevich F (2014) Capacidad micotrófica y eficiencia de consorcios con hongos micorrícicos nativos de suelos de la Provincia de Buenos Aires con manejo contrastante. *Revista Argentina de Microbiología* 46(2):133-143.
11. Kjoller R, Rosendahl S (2000) Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism). *Plant and Soil* 226(2):189-196.
12. Consolo VF, Monaco CI, Cordo CA, Salerno GL (2012) Characterisation of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economical important crops in Argentina. *World J Microbiol Biotechnol* 28(4):1389-1398.







CAPÍTULO 2

Comunidades fúngicas del suelo: impacto en la sustentabilidad de los cultivos extensivos en regiones templadas

Luciana Belén Silvestro^{1,2}, Cristina Soledad Merlos^{1,2},
Germán Pacheco^{1,2}, Fernando Biganzolli³, Horacio Forján⁴,
Lucrecia Manso⁴, Sebastián Pelizza⁵, María Virginia Moreno^{1,2}

¹Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología, (BIOLAB) CONICET-CICBA, Fac. de Agronomía, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Rep. de Italia # 780, Azul CP B7300, Prov. Buenos Aires, Argentina.

²Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC-CONICET), y Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), Mar del Plata, Argentina.

³Departamento de Métodos Cuantitativos y Sistemas de Información, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

⁴Estación Experimental Barrow-INTA, Tres Arroyos, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

⁵ Instituto de Botánica Carlos Spegazzini, Fac. de Cs. Naturales y Museo, Univ. Nac. de La Plata, Prov. Buenos Aires, Argentina.
vmoreno@faa.unicen.edu.ar

RESUMEN

Las regiones agrícolas templadas proyectan una expansión del área de cultivo, lo cual da continuidad a los procesos de intensificación. Comprender la respuesta de los componentes fúngicos del suelo es crucial, dado que pueden subsistir en ese ambiente como saprófitos, parásitos o simbiosntes. Conocer estos organismos no se limita a estudiar el rol que juegan en el equilibrio ecológico





como degradadores de restos orgánicos y como reguladores de poblaciones de fitopatógenos y plagas; sino que implica reconocer su capacidad de producir enzimas y metabolitos secundarios de potencial uso biotecnológico. Nuestro objetivo es evaluar el efecto antropogénico y gradientes ambientales sobre la diversidad y dinámica de las comunidades fúngicas de suelos agrícolas y poco o no explorados. Considerando a los hongos como uno de los eslabones fundamentales de la cadena productiva en el marco de una agricultura sustentable, se identifican las especies fúngicas obtenidas por medio de métodos clásicos y moleculares, a los efectos de obtener colecciones de interés científico/biológico y potencial uso biotecnológico. Estos estudios pretenden aportar resultados que parcialmente sustenten o modifiquen aspectos de la aplicación de las diferentes prácticas agrícolas utilizadas en agroecosistemas templados.

INTRODUCCIÓN

La producción de cultivos extensivos en las regiones templadas ha adquirido una mayor relevancia en las últimas décadas, debido a la incorporación de nuevas tecnologías. En este contexto, los países productores de cereales proyectan una expansión del área de cultivo, lo cual provocará una continuidad en los procesos de intensificación. Estos procesos implican una respuesta integrada de los componentes de las comunidades de microorganismos del suelo. Esta línea de investigación se plantea en el marco de la agricultura sustentable, cuyos objetivos son según la Sociedad Americana de Agricultura: *“una agricultura sustentable es aquella que, en el largo plazo, promueve la calidad del medio ambiente y los recursos base de los cuales depende la agricultura, provee las fibras y alimentos necesarios para el ser humano; es económicamente viable y mejora la calidad de vida de los agricultores y la sociedad en su conjunto”*. Por lo tanto, consideramos que el alcance de nuestros estudios es principalmente nacional, pero puede resultar de interés en todos los sitios del mundo donde se practiquen estos sistemas, particularmente en las regiones templadas del mundo (Chile, Uruguay, Estados Unidos de América, Canadá, Europa Occidental y algunas regiones de Australia).

Entre los integrantes de los microorganismos del suelo se encuentran los hongos, cuya relevancia está dada por su papel en el equilibrio de los ecosistemas. Los mismos actúan como descomponedores de la materia orgánica, proporcionan nutrientes a las plantas y son potenciales indicadores de la salud





del ecosistema. Asimismo, participan en la formación de agregados del suelo, la estimulación del crecimiento vegetal, la patogenicidad y la supresión de enfermedades de los cultivos. De esta manera, también pueden actuar tanto como fuente o sumidero para muchos elementos, así también como agentes de producción de metabolitos secundarios de interés industrial y degradadores de agroquímicos.

La abundancia de los hongos del suelo se estimó en el orden de 10^5 - 10^6 ufc/gramo de suelo [1]. Hasta el presente, se han descripto unas 100.000 especies en el Reino Fungi, pero su número se estima en unos 5 millones [2]. El término Fungi abarca globalmente todos los organismos que pertenecen a los Eumycota (hongos verdaderos). El grupo Eumycota es monofilético y abarca unos 10 phyla, de los cuales los Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Glomeromycota son los más conocidos. La fisiología de estos organismos va a depender del tipo de metabolismo que posean y el medio edáfico en el cual se estén desarrollando. Las principales influencias del medio suelo sobre las comunidades fúngicas, están dadas por el nivel y el tipo de materia orgánica, el pH, la aplicación de fertilizantes orgánicos e inorgánicos, el contenido de humedad, la aireación, la temperatura, la profundidad en el perfil del suelo, la estación del año y la composición de la vegetación nativa o cultivada.

Basándonos en estas premisas, esta línea de investigación propone la necesidad de conocer y evaluar el efecto de los pulsos o intromisiones antropogénicas ejercidas por los diferentes manejos agrícolas sobre la diversidad y la dinámica de la comunidad fúngica del suelo, y considerarla como uno de los eslabones esenciales de la cadena de producción en el marco de la agricultura sostenible. El objetivo principal consiste en utilizar/aprovechar los conocimientos de diversidad y dinámica fúngica para el desarrollo de estrategias de Manejo Integrado de micosis en cultivos extensivos en los sistemas agrícolas. Asimismo, se propone incrementar los estudios en ambientes poco/no explorados a los efectos de incorporar especies ya conocidas o no de potencial interés científico/tecnológico.

SITUACIÓN ACTUAL EN LA ARGENTINA

En nuestro país, desde el 2000 a la actualidad, se han realizado trabajos con hongos de suelos agrícolas, principalmente sustentados por metodologías convencionales basadas en el uso de medios de cultivo para estudiar la diversi-





dad fúngica, entre otros [3]. Asimismo, en los últimos cinco años han surgido estudios de comunidades fúngicas del suelo mediante el empleo de metodologías moleculares [4]. Siendo el más relevante en cuanto a disponibilidad de secuencias el estudio realizado por Rascovan et al. [5].

METODOLOGÍA DE ESTUDIO

Al momento de estimar “la diversidad de hongos en el suelo”, se debe ser precavido. Un punto crítico es el tamaño y la heterogeneidad de las muestras, dado que se ha comprobado que afecta a la distribución y la ocurrencia de hongos en el suelo [6]. Sumado a ello, el gran número de especies que habitan el suelo las diferencias entre los sitios de estudio, la falta de personal capacitado y de manuales de identificación para caracterizar las especies.

Durante décadas, la micología ha basado sus estudios de diversidad empleando métodos de cultivo y observación directa. Estas metodologías han permitido conocer la diversidad de hongos del suelo asociados a diferentes parámetros de calidad del suelo, a procesos de mineralización de la materia orgánica, a detectar suelos supresivos y corroborar el efecto de la aplicación de fungicidas y herbicidas [7]. El uso de las herramientas tradicionales debe considerarse como la principal herramienta de aproximación a la realidad. Sin embargo, se han enunciado las restricciones de este tipo de estudio, señalando que el porcentaje de hongos cultivables varía desde un mínimo de $<1\%$ hasta un máximo de 100% , dependiendo de los organismos y del material estudiado [8]. Sumado a esto, algunos hongos pueden permanecer morfológicamente indistinguibles en condiciones de laboratorio o bien no pueden ser cultivados, tales como aquellos hongos de nutrición biotrófica, o que no producen estructuras fértiles que permitan su identificación. Por lo tanto, muchas veces este tipo de investigaciones se ven obstaculizadas por falta de técnicas disponibles para llevar a cabo un aislamiento exhaustivo de los hongos del suelo.

A modo de complementar este tipo de estudios, a partir del desarrollo de herramientas moleculares como lo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) junto a cebadores de regiones conservadas, como lo son los del DNA ribosomal (DNAr), se ha logrado identificar una fracción más grande de especies en las muestras ambientales, sobre todo de suelo [9]. Si bien son técnicas que al principio estuvieron limitadas por la escasa disponibilidad de datos de secuencias de referencia fiables, a la actualidad son muy utilizadas tanto me-





dante el uso de PCR convencional como de cuantitativa (PCR-qPCR) [9]. La PCR con cebadores para regiones conservadas, combinada con electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE), ha sido una de las más utilizadas a los efectos de comparar perfiles de comunidades procedentes de diferentes muestras ambientales [10]. Esta metodología así como otras, tales como el análisis de polimorfismo mediante el uso de variación de longitud de fragmentos terminales de restricción (TRFLP), el análisis automatizado del espacio intergénico del DNAr (ARISA), [11] y la pirosecuenciación, han sido utilizados para el estudio de la diversidad de los hongos. Diversos enfoques se le han dado a estos estudios, entre ellos, la interpretación de los problemas de desarrollo, taxonomía y distribución de las especies. Con el desarrollo de estas investigaciones, la disponibilidad de secuencias del genoma de los hongos filamentosos ha incrementado, y por lo tanto, el número de estudios de los hongos ambientales también.

En los estudios enfocados a las comunidades fúngicas del suelo que se llevan a cabo en el laboratorio, se emplean tanto metodologías clásicas como moleculares: aislamiento, cultivo e identificación morfológica, a lo que se suma principalmente el uso de la PCR con cebadores adecuados con especificidad hacia DNA fúngico. Los cebadores principalmente corresponden a las regiones conservadas del DNAr, al espaciador transcritpo interno (ITS), a la subregión pequeña (18S), a la subunidad 5.8S y a la subunidad grande (28S).

Las herramientas tradicionales nos han permitido y permiten aislar, conservar y conocer acerca de la biología de los integrantes de la comunidad. También nos permitieron generar colecciones de hongos de aplicación biotecnológica como aquéllos de potencial efecto antagonista, los denominados biocontroladores (ya sea de insectos o de otros hongos), de los considerados degradadores de agroquímicos (a través de procesos de biotransformación fúngica), y de aquellas especies fúngicas que se comportan como bioindicadores. En este último caso, las variaciones en su número y diversidad pueden ser una buena señal de los cambios en la actividad biológica del suelo.

Las herramientas moleculares no han permitido detectar perfiles moleculares de diferentes ambientes con gradientes antropogénicos y naturales y poder comparar su composición.

Por lo tanto, es complejo concluir si una técnica para el estudio de la diversidad es más apropiada que la otra [12]; por el contrario, se considera que son complementarias.





Figura 1. Estación Experimental Barrow, (38° 19' 25" S; 60° 14' 33" W), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Tres Arroyos, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

PRINCIPALES RESULTADOS OBTENIDOS

A los efectos de detectar la potencialidad de los hongos del suelo como indicadores biológicos de cambios introducidos en los sistemas agrícolas, se han evaluado diferentes propiedades químicas y biológicas de los suelos. Los resultados reflejan una serie de estudios iniciados en el año 2009, dirigidos a evaluar los efectos de las diferentes prácticas agrícolas sobre la diversidad de las comunidades fúngicas del suelo cultivado (Fig. 1). Los resultados obtenidos tienen como propósito aportar conocimientos acerca del efecto de diferentes secuencias de cultivos, sistemas de labranzas y profundidades de muestreo, sobre la comunidad fúngica y la actividad biológica del suelo en sistemas agrícolas





del sudeste bonaerense. Todos los ensayos son de larga duración y se encuentran instalados en la Chacra Experimental Integrada Barrow, bajo la coordinación del Ing. Agr. Horacio Forján. A partir de los resultados obtenidos, se ha observado, en los sistemas bajo siembra directa (SD) una clara estratificación en profundidad del carbono orgánico del suelo (COS). Las actividades biológicas dependientes de la disponibilidad del COS, como lo son la respiración basal del suelo (RB) y actividades enzimáticas, han respondido de la misma manera en lo que respecta a un gradiente de profundidades. En general, estas actividades son mayores en los primeros centímetros del suelo (0-5 cm). Esto responde a que en los sistemas bajo SD, los restos vegetales quedan en superficie y la mineralización de la materia orgánica es mucho mayor ahí respecto a las capas mas profundas. Sin embargo, en los ensayos evaluados en los cuales se compara una labranza del tipo SD versus una labranza convencional (LC), esta estratificación no se observó. Esto es debido a que en la LC los restos vegetales se incorporan al suelo mecánicamente, por lo tanto, las variables como la RB y las actividades enzimáticas no presentan un comportamiento diferentes entre los primeros centímetros (0-5 cm) del suelo respecto a los más profundos (5-20 cm). Se ha observado que estas propiedades del suelo dependen a su vez, de la época de muestreo; de esta manera se ve una clara estacionalidad en la respuesta de las mismas, siendo esta variable más fuerte que el tipo de labranza o la rotación de cultivos planteada para esa zona. En este contexto, nuestros resultados sugieren que las propiedades biológicas del suelo son muy dinámicas, por lo que tienen la ventaja de servir de señales tempranas de disturbios. En este estudio se pudo determinar la alta sensibilidad de las mismas respecto a la RB y al COS.

En cuanto a estructura de la comunidad fúngica de suelos agrícolas, en los estudios realizados mediante metodologías tradicionales, se ha observado una clara preponderancia de integrantes del Phylum Ascomycota por sobre los demás. Los datos de ocurrencia de aislamientos, demostraron un mayor número de propágulos fúngicos en lotes bajo manejo con pasturas, que en lotes provenientes de agricultura intensa. En general, en los resultados obtenidos no se observó un efecto directo de los sistemas de labranza o las rotaciones de cultivo sobre la diversidad alfa de las comunidades fúngicas estudiadas. Tampoco se observó una correlación entre los estimadores de diversidad y la actividad biológica del suelo. Sin embargo, sí se observó que variables como estacionalidad, profundidad y tipo de manejo modifican la estructura de la comunidad fúngica del suelo.





Figura 2. Salinas de Bustos a 1.096 m sobre el nivel del mar (S 30° 18' 09,4") (WO 67° 34' 40,6"), Provincia de La Rioja, Argentina.

En lo que respecta a intervenciones antropogénicas como resultado de la deforestación de bosques nativos, como lo son el desmonte y la implementación de sistemas agrícolas, hemos observado cambios en la estructura de las comunidades. Los resultados preliminares no han permitido detectar la diferente composición de la comunidad fúngica de suelos de monte y desmonte, respecto a aquellos donde se ha implantado soja, procedentes de la región del monte chaqueño.

Mediante metodologías moleculares (PCR-ITS-DGGE), se ha podido estimar el perfil molecular de las comunidades fúngicas de suelos agrícolas, de la rizósfera de plantas nativas de la Boca de las Sierras (Prov. de Buenos Aires) y de suelos a diferentes altitudes de la provincia de La Rioja (Fig. 2). Los principales





resultados obtenidos han reflejado la diferente composición de estas comunidades reflejándose no sólo de los cultivables sino también de los no cultivables. Los perfiles obtenidos permitieron comparar las comunidades de diferentes hábitats y determinar los niveles de similitud entre las mismas.

El uso de herramientas tradicionales como lo son el aislamiento y cultivo de los hongos del suelo, nos ha permitido contar con una colección de aproximadamente 600 cultivos de interés científico y tecnológico. Entre éstos, se hallan colecciones de *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp., que están siendo evaluadas como biotransformadoras de sustratos naturales y productoras de metabolitos secundarios de interés agroindustrial, entre otras potenciales aplicaciones.

POTENCIALIDADES DE LA LÍNEA DE ESTUDIO

Los hongos en los sistemas agrícolas son un eslabón fundamental en la cadena productiva. Por lo tanto, esta línea de trabajo permitirá **sustentar o modificar** aspectos de la aplicación de las diferentes prácticas agrícolas utilizadas en agroecosistemas templados. Los conocimientos generados a partir del estudio de comunidades en sistemas no agrícolas permite contar con datos de pérdidas de biodiversidad por intervenciones antropogénicas. Asimismo, permite generar colecciones de géneros de interés agro-industrial como ser *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp. entre otros.





REFERENCIAS

1. Cresswell N, Wellington EMH (1992) Detection of genetic exchange in the terrestrial environment. *Genetic Interactions among Microorganisms in the Natural Environment*, eds. Wellington EMH, van Elsas JD (Pergamon Press Oxford, UK), pp 59-82.
2. Blackwell M (2011) The Fungi: 1, 2, 3...5.1 million of species? *Am J Bot* 98(3):426- 438.
3. Moreno MV et al. (2013) Diversidad de Hongos en suelos agrícolas. *Microbiología Agrícola. Un aporte de la Investigación en Argentina*, ed. Albanesi A, (Magna, Tucumán Argentina), pp 157-177.
4. Vargas Gil S et al. (2011) Soil microbial communities response to tillage and crop rotation in a soybean agroecosystem in Argentina. *Eur J Soil Biol* 47(1):55-60.
5. Rascovan N et al. (2013) The PAMPA datasets: a metagenomic survey of microbial communities in Argentinean pampean soils. *Microbiome* (1)21.
6. Schwarzenbach K, Enkerli J, Widmer F. (2007) Objective criteria to assess representativity of soil fungal community profiles. *J Microbiol Methods* 68(2):358-366.
7. Cantrell SA, Casillas-Martinez, Molina M. (2006) Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycol Res* 110(8):962-970.
8. Niemeier RT; Sivasubramani SK; Reponen T; Grinspun SA (2006) Assessment of fungal contamination in moldy homes: Comparison of different methods. *J Occup Environ Hyg* 3(5):262-273.
9. Klaubaf S et al. (2010) Molecular diversity of fungal communities in agricultural soils from lower Austria. *Fungal Divers* 44(1):65-75.
10. Gao Z, Li B, Zheng C, Wang G (2008) Molecular Detection of Fungal Communities in the Hawaiian Marine Sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata*. *App Environ Microbiol* 74(19):6091-6101.
11. Avis PG, Branco S, Tang Y, Mueller GM (2010) Pooled samples bias fungal community Descriptions. *Mol Ecol Resour* 10(1):135-141.
12. Kirk J et al. (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods* 58(2):169-188.





CAPÍTULO 3

Análisis de hongos de interés en sistemas agro-alimentarios

**Eliana Castañares, María Inés Dinolfo, María Soledad Nogueira,
Mauro Martínez, Walter Pacheco, Sebastián Stenglein**

Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB-AZUL).
Facultad de Agronomía. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos
Aires. Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología
(INBIOTEC-CONICET)-CICBA, y Fundación para Investigaciones Biológicas
Aplicadas (FIBA), Mar del Plata, Argentina.
stenglein@faa.unicen.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Los cereales ocupan un lugar de privilegio a nivel mundial, ya que son la base de la alimentación tanto humana como animal. El trigo, junto con el arroz y el maíz, componen los tres granos básicos que forman parte de la dieta humana. El mismo ha sido empleado para distintos usos, obteniéndose como producto principal la harina para la fabricación de pan, del cual se obtiene además sémola y almidón utilizados como adhesivos en la industria del papel y la elaboración de alcohol.

La Argentina es el mayor productor sudamericano de trigo con un área total de 3.648.070 hectáreas sembradas logrando una producción total de 9.188.339 toneladas en la campaña 2013/14 (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca).

Dada la gran diversidad genética que presenta el trigo, esta especie puede crecer y desarrollarse en variados ambientes. Las principales regiones trigueras argentinas abarcan la provincia de Buenos Aires, sur de Entre Ríos, centro-sur de Santa Fe, sudoeste de Córdoba y este de la provincia de la Pampa.





Otro de los cultivos de relevancia en nuestro país es la cebada, cuyo destino principal es la industria cervecera y la alimentación animal. En la campaña 2013/2014, Argentina registró una superficie sembrada de 1.263.026 hectáreas con una producción de 4.705.160 toneladas (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca). Las principales regiones argentinas destinadas a la producción de cebada son el sudeste de la provincia de Buenos Aires, la zona del sudoeste bonaerense en conjunto con la Pampa, la zona del área central de Buenos Aires, y la zona formada por el este de Santa Fe y oeste de Córdoba.

En cuanto a la época de siembra, tanto el trigo como la cebada, son cultivos de invierno, es decir, se siembran a finales de otoño y principios de invierno y se cosechan a finales de la primavera principios de verano. Ambos cultivos suelen ser antecidos por maíz, sorgo, girasol o soja en las áreas cultivadas.

El trigo y la cebada suelen sufrir enfermedades relacionadas con distintos patógenos, entre los que podemos mencionar a aquellas provocadas por hongos. Una de las enfermedades más importantes que afecta al trigo y la cebada, es la fusariosis de la espiga, causada por el género *Fusarium*, siendo *F. graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum* y *F. culmorum* las especies de mayor ocurrencia a nivel mundial. Esta enfermedad ocurre en regiones de climas húmedos y altas temperaturas coincidiendo con los estadios de floración de ambos cultivos. Los primeros síntomas aparecen pocos días después de la infección y son caracterizados por el blanqueamiento de las espigas, observándose a los granos infectados arrugados, de coloración blanco-rosada a pardo clara, dependiendo del momento de la infección y de las condiciones climáticas preponderantes durante el desarrollo de la enfermedad [1] (Fig. 1). Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de daños cuantitativos a través de la reducción del rendimiento, el poder germinativo y vigor de las semillas y por la presencia de productos resultantes del metabolismo secundario de los hongos, denominados micotoxinas. Dentro de estas últimas, las más importantes son aquellas pertenecientes al grupo de los tricotecenos, los que incluyen al deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxyscirpenol (DAS), toxina T-2 y HT-2, que provocan efectos citotóxicos, neurotóxicos y de inhibición de síntesis proteica en consumidores humanos y animales. Fuera del grupo de los tricotecenos, existen otras micotoxinas como las zearalenonas (ZEA), con efecto estrogénico principalmente en cerdos y aves de corral, las eniatinas (ENN), con efecto mutagénico y genotóxico en líneas celulares, las fumonisinas (FUM), rotulados como posibles carcinógenos humanos.





Figura 1. Síntomas de fusariosis en muestras de trigo (izquierda) y cebada (derecha).

Muchas micotoxinas son estables luego de procesos normales de elaboración de alimentos y bebidas, por lo tanto es posible detectarlas no sólo en alimentos sin procesar, sino también en los procesados. Por ejemplo, muestras de cebada con concentraciones de DON mayores o iguales a $60 \mu\text{g/g}$ son generalmente descartadas en la industria cervecera, siendo posiblemente el efecto visual más conocido e indicativo de contaminación de micotoxinas de *Fusarium*, el de “gushing” (salida abrupta de espuma de la botella) en la cerveza [2]. En el trigo, los granos infectados presentan una reducción del tenor proteico y del gluten, disminuyendo la calidad de las harinas [3]. La calidad industrial se ve afectada porque el hongo es capaz de destruir los gránulos de almidón, las paredes celulares y las proteínas del endosperma. Todo ello redunda en una menor capacidad





de molienda para la elaboración de panificados y pastas de trigo. Además, Schollenberger et al. [4] sugirieron que las micotoxinas se ubican mayormente en la capa superior de los granos, lo que indicaría que las harinas menos refinadas serían las que presentan mayor contaminación por micotoxinas.

En cuanto a la reglamentación de micotoxinas en trigo y cebada, la Unión Europea establece niveles máximos para DON, ZEA, FUM, T-2 y HT-2 dependiendo el producto derivado. En nuestro país, aun no existe reglamentación en cuanto a las micotoxinas producidas por el género *Fusarium*. En el año 2013, se ha establecido un anteproyecto de niveles máximos de DON en cereales y sus derivados, donde se consideran como valores límites 1 µg/g para las harinas y 0,5 µg/g para los alimentos a base de cereales destinados a lactantes y niños de corta edad.

En la naturaleza, las plantas están continuamente amenazadas por la presencia de distintos patógenos que afectan la aptitud biológica de la planta. Por ello, distintas estrategias se han desarrollado para prevenir la colonización de distintas especies de hongos patógenos en los granos de cereales, como lo son la rotación de cultivos y el uso de variedades tolerantes resultantes de los programas de mejoramiento [5].

Arabidopsis thaliana es una crucífera con reconocidos atributos, entre los cuales se destacan su pequeño tamaño, un tiempo de generación relativamente rápido, su genoma reducido completamente secuenciado (100 Mb) y la disponibilidad de alrededor de 150 accesiones diferentes, incluyendo aquellas alteradas o inhibidas en su vía de transducción de señales [6]. Todas estas cualidades convierten a *Arabidopsis* en un sistema modelo para estudios de interacción con una amplia variedad de organismos, incluyendo patógenos virales, bacterianos y fúngicos [7]. En los últimos años, una nueva planta modelo ha sido propuesta para estudiar la interacción planta-patógeno, *Brachypodium distachyon* [8]. Esta planta cuenta con características similares a las de *A. thaliana*, pero al ser *B. distachyon* una gramínea, como el trigo y la cebada, lo hace aún más atractivo para el estudio de interacciones con patógenos de esta familia de plantas [9].

Por todo lo expuesto, los objetivos de esta línea de investigación son:

- Evaluar la variabilidad patogénica y genética de especies del género *Fusarium*.
- Identificar el potencial toxicogénico y/o las toxinas producidas por los patógenos.





- Identificar germoplasma resistente/tolerante a la enfermedad y/o acumulación de toxinas causadas por las especies del género *Fusarium*.
- Estudiar los mecanismos de interacción fisiológicos y moleculares relacionados a la señalización y expresión de distintos genes involucrados en patosistemas, utilizando como especies modelos a *B. distachyon* y *A. thaliana*, para aumentar el conocimiento de interacción y poder identificar genes de interés.

HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS APLICADAS A LA LÍNEA DE TRABAJO

Las especies de *Fusarium* son identificadas morfológicamente mediante observaciones microscópicas. Luego, se confirman molecularmente con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual se utilizan cebadores específicos para la especie, siendo necesario extraer el DNA mediante protocolos preestablecidos.

La potencial producción de toxinas se lleva a cabo mediante PCR con cebadores específicos. Se cuenta con cebadores para tricotecenos en general, NIV, DON y sus derivados, ZEA, ENN, entre otros. A su vez, se llevan a cabo en el laboratorio y/o en conjunto con otros grupos de trabajo, el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía gaseosa (GC), las cuales se realizan para cuantificar las micotoxinas presentes en muestras de granos y sus derivados, como así también para evaluar “in vitro” la capacidad toxicológica de los aislamientos.

La variabilidad genética de los aislamientos es evaluada mediante la utilización de distintos marcadores moleculares, entre ellos la amplificación de fragmentos ubicados entre secuencias repetitivas simples (ISSR), los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y los polimorfismos de amplificación de secuencias relacionadas (SRAP). Por otra parte, la técnica de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) es utilizada para estimar la abundancia de ciertos grupos fúngicos dependiendo la especificidad de los cebadores.

La interacción planta-patógeno es estudiada mediante la utilización de distintas líneas de *A. thaliana* y *B. distachyon*, evaluando la expresión génica de genes involucrados en el patosistema mediante la técnica de transcriptasa reversa-PCR (RT-PCR) para lo cual se requiere la previa extracción del RNA mediante protocolos preestablecidos.





RESULTADOS OBTENIDOS POR LA LÍNEA DE TRABAJO

Se cuenta con una amplia colección de aislamientos del género *Fusarium* obtenidos de trigo y cebada de distintos sitios de cultivo de estos cereales en la Argentina y en menor cantidad, provenientes de otros países. Todos los aislamientos han sido identificados morfológica y molecularmente.

Los aislamientos de *F. graminearum* obtenidos de cebada y trigo fueron evaluados en cuanto a su capacidad toxicogénica y toxicológica [10, 11]. Del mismo modo, los aislamientos de *F. poae* fueron evaluados en su potencial producción de NIV, para lo cual fue necesario diseñar previamente un nuevo set de cebadores [12].

En lo que respecta a la variabilidad genética, ya se han realizado estudios en *F. poae* [13–15] y se están llevando a cabo en *F. graminearum*. Además, se está comenzando con el estudio de la diversidad de especies obtenidas de granos de cebada.

A su vez, para los estudios de interacción planta-patógeno se han realizado ensayos a campo en donde se evaluaron la severidad y la producción de micotoxinas en distintas variedades de trigo y cebada inoculadas con *F. poae*, *F. graminearum* y *F. pseudograminearum* [16]. Se está comenzando con los trabajos de interacción mediante la utilización de distintos mutantes de *A. thaliana*, como así también de distintas líneas de *B. distachyon* con especies de *Fusarium*.

POTENCIALIDADES DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Esta línea de trabajo contempla dentro del grupo al Dr. Sebastián Stenglein (Ing. Agrónomo, de grado) Investigador Adjunto del CONICET, la Dra. María Inés Dinolfo (Lic. en Genética, de grado) Becaria Doctoral CONICET, la Lic. en Tecnología de los Alimentos Eliana Castañares, Becaria Doctoral CONICET, la Lic. en Biotecnología Soledad Nogueira, Becaria Doctoral CONICET, el Sr. Mauro Martínez, tesista de grado para optar el título de Ingeniero Agrónomo y el Sr. Walter Pacheco, Personal de Apoyo de la CIC. La interacción de los integrantes del grupo con distintas formaciones y entre otros grupos que interactúan directamente con esta línea de trabajo, permite diagramar y analizar desde distintos enfoques las tareas de investigación y desarrollo en el presente y futuro, con un potencial de trabajo en permanente crecimiento.





OFERTAS TECNOLÓGICAS

Actualmente no se cuenta con servicios a terceros, pero dada la importancia de la presencia de toxinas de este género, se plantea ofrecer la identificación de las especies presentes en distintos sustratos, como así también evaluar la potencial producción de toxinas mediante PCR y la cuantificación de las mismas mediante ELISA.





REFERENCIAS

1. Reis E, Carmona M (2002) Fusariosis del trigo Biología, epidemiología y estrategias para su manejo. BASF Argentina S.A. Buenos Aires.
2. Schwartz PB, Casper HH, Beattie D (1995) Fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing. *J Am Soc Brew Chem* 53(3):121-127.
3. Mesterházy A, Bartók T (1996) Control of Fusarium Head Blight of wheat by fungicides and its effect of the toxin contamination of the grains. *Pflanzenschutz-Nachr* 49(2):181-197.
4. Schollenberger M, Müller HM, Süfle M, Suchy S, Planck S, Drochner W (2005) Survey of *Fusarium* toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. *Int J Food Microbiol* 97(3):317-326.
5. Berrocal-Lobo M, Molina A (2008) *Arabidopsis* defence response against *Fusarium oxysporum*. *Trends Plant Sci* 13(3):145-150.
6. Van Poecke RMP, Dicke M (2004) Indirect defence of plants against herbivores: using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Plant Biol* 6(4):387-401.
7. Kunkel BN (1996) A useful weed put to work: genetic analysis of disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Genet* 12(2):62-69.
8. Peraldi A, Griffe LL, Burt C, McGrann GRD, Nicholson P (2014) *Brachypodium distachyon* exhibits compatible interactions with *Oculimacula* spp. and *Ramularia collo-cygni*, providing the first pathosystem model to study eyespot and ramularia leaf spot diseases. *Plant Pathol* 63(3):554-562.
9. Vogel JP, Garvin DF, Mockler TC, Schmutz J, Rokhsar D, Bevan MW (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463(7282):763-768.
10. Castañares E, Ramirez Albuquerque D, Dinolfo MI, Fernández Pinto V, Patriarca A, Stenglein SA (2014) Trichothecenes genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina. *Int J Food Microbiol* 179:57-63.
11. Martínez M, Castañares E, Dinolfo MI, Pacheco WG, Moreno MV, Stenglein SA (2014) Presencia de *Fusarium graminearum* en muestras de trigo destinadas a consumo humano. *Rev Arg Microbiol* 46(1):41-44.
12. Dinolfo MI, Barros GG, Stenglein SA (2012) Development of a PCR assay to detect the potential production of nivalenol in *Fusarium poae*. *FEMS Microbiol Lett* 332(2):99-104.





13. Dinolfo MI, Stenglein SA, Moreno MV, Nicholson P, Jennings P, Salerno GL (2010) ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. *Eur J Plant Pathol* 127(4):483–491.
14. Dinolfo MI, Castañares E, Stenglein SA (2014a) Characterization of a *Fusarium poae* world-wide collection by using molecular markers. *Eur J Plant Pathol* 140(1):119–132.
15. Dinolfo MI, Castañares E, Stenglein SA (2014b) SRAP as informative molecular marker to study the *Fusarium poae* genetic variability. *J Phytopathol*. In press.
16. Stenglein SA, Dinolfo MI, Barros GG, Bongiorno F, Chulze SN, Moreno MV (2014) *Fusarium poae* pathogenicity and mycotoxin accumulation on wheat and barley. *Plant Dis* 98(12):1733–1738.
17. Cabré ME, Solman SA, Nuñez MN (2010) Creating regional changes scenarios over southern South America for the 2020's and 2050's using the pattern scaling technique: validity and limitation. *Climatic Changes* 98(3–4):449–469.







CAPÍTULO 4

Control de insectos plaga de importancia agrícola por medio de *Bacillus thuringiensis*

Corina M Berón, Graciela L Salerno

Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC-CONICET), y Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), Mar del Plata, Argentina.
cberon@fiba.org.ar

RESUMEN

Históricamente el manejo de las poblaciones de insectos plaga se ha basado en el uso de insecticidas de naturaleza química, responsables de grandes perjuicios al medio ambiente, a la salud de las poblaciones humanas urbanas y rurales, y de la inducción de resistencia a los principios activos utilizados en los insectos. El empleo de agentes microbianos de control biológico, tales como las bacterias, constituye una alternativa promisoría desde el punto de vista técnico, económico y ambiental, ya que su acción se restringe solamente a organismos blanco, no causando efectos nocivos hacia el ecosistema, hacia el resto de las poblaciones naturales y al hombre. Por otro lado, su utilización permite reducir la contaminación de suelos y cuerpos de agua generando una mejor calidad de vida. La bacteria *Bacillus thuringiensis* es el agente de control microbiano más utilizado a nivel mundial ya que produce toxinas (o proteínas Cry) que al ser ingeridas por un insecto susceptible se unen específicamente a receptores presentes en el intestino del mismo provocando su disrupción y como consecuencia de ello la muerte del insecto.





Las investigaciones tendientes a seleccionar y caracterizar nuevas cepas de bacterias entomopatógenas, incluyendo a los genes que codifican las toxinas, representan un importante aporte al control de insectos plaga y al manejo de resistencias generadas por aplicaciones de bioformulados durante largos períodos de tiempo. El objetivo central de esta línea de investigación es aislar y caracterizar cepas nativas de la bacteria entomopatógena *B. thuringiensis* que sean capaces de controlar poblaciones de insectos dañinos, que puedan desarrollarse como alternativas biológicas de interés regional y que puedan ser utilizados en el marco del Manejo Integrado de insectos plaga. Desde el inicio de esta línea de investigación se ha realizado el aislamiento de cepas nativas de esta bacteria, se lleva a cabo la caracterización de las toxinas presentes en ellas por medio de técnicas bioquímicas y moleculares, se han realizado ensayos de toxicidad contra insectos de los órdenes coleóptera y lepidóptera y se han desarrollado diversas metodologías moleculares para identificar y caracterizar proteínas Cry.

INTRODUCCIÓN

Muchas prácticas agrícolas que se utilizan en la actualidad son responsables del aumento en la cantidad y calidad de muchos productos alimenticios, sin embargo, también favorecen a la multiplicación de organismos, tales como algunos insectos, que cuando se establecen en poblaciones numerosas pueden provocar daños económicos y grandes pérdidas a la producción. Tradicionalmente para el control de insectos plaga se utilizan productos químicos sintéticos, sin embargo, el uso excesivo de este tipo de productos traen aparejadas importantes consecuencias negativas, como la contaminación de aguas, suelos y alimentos, efectos tóxicos en la flora y la fauna no blanco de su acción, concentración de estos insecticidas químicos en la cadena alimentaria y selección de poblaciones de insectos resistentes a dichos productos. Como respuesta al desarrollo de resistencia a muchos agrotóxicos por parte de algunos insectos, se han producido productos aún más tóxicos, resultando en la mayoría de los casos más peligrosos y de mayor residualidad en el ambiente. A esta serie de aspectos adversos debe sumarse el interés público, y en aumento, por la preservación del medio ambiente. Todas estas consideraciones han sido las principales causas que han llevado a buscar alternativas más seguras para el ser humano, el medio ambiente y otros organismos, en el control y manejo de poblaciones de insectos plaga [1]. Una de las alternativas más promisorias al uso de insecticidas





químicos es el empleo de microorganismos entomopatógenos en el control de insectos dañinos. Entre éstos, la bacteria *Bacillus thuringiensis*, ha resultado tener un importante efecto insecticida y a su vez presentar una alta especificidad. Se encuentra ampliamente demostrado que esta bacteria no es patógena para mamíferos, aves, anfibios o reptiles y que es altamente específica contra los invertebrados susceptibles [2]. Los productos basados en sus proteínas insecticidas generalmente tienen un costo de desarrollo y registro mucho menor que muchos productos sintéticos. Sumado a esto, el modo de acción de estas proteínas difiere completamente del modo de acción de los productos convencionales, y esto hace que sean componentes clave dentro de las estrategias de manejo integrado de plagas dirigido hacia la preservación de los enemigos naturales y del manejo de resistencias a los agrotóxicos por parte de los insectos plaga.

A pesar de que la bacteria *B. thuringiensis* fue determinada como tal a principios del siglo pasado, a partir de la Segunda Guerra Mundial, cuando comenzaron a divisarse las primeras dificultades provocadas por el uso de insecticidas sintéticos, se estableció como una alternativa real en el control de plagas. En la actualidad, los productos desarrollados a partir de esta bacteria constituyen los bioinsecticidas de mayor producción y aplicación en todo el mundo, representando el 90 % del mercado de los agrotóxicos de origen biológico, aunque solo constituye el 2 % de los insecticidas en su conjunto. También existen en el mercado plantas genéticamente modificadas resistentes al ataque de algunos insectos, a las que se les han incorporado genes que codifican toxinas de esta bacteria [3].

B. thuringiensis comprende un grupo de bacterias aeróbicas, Gram positivas formadoras de esporas y capaces de formar cristales de naturaleza proteica durante la esporulación, en la fase estacionaria de su ciclo celular. Esta inclusión de tipo cristalina (δ -endotoxina o cuerpo paraesporal) fue caracterizada inicialmente como patógena de insectos de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera y Diptera, aunque más recientemente se ha demostrado su toxicidad contra Ordenes de insectos como Hymenoptera, Homoptera y Mallophaga, así como de algunos Protozoos, Acaros y Nematodos. El principal factor de patogenicidad contra insectos plaga de la agricultura es la δ -endotoxina, que constituye un agregado de moléculas proteicas (proteínas Cry) y no es tóxico por sí mismo. Se trata en realidad de protoxinas de 130-140 o 60-70 kDa que deben ser solubilizadas para entonces producir la liberación de las toxinas biológicamente activas. Las δ -endotoxinas pueden formar distintos tipos de cristales,





que difieren en su forma, tamaño y patogenicidad. Hasta el momento han sido clonados y secuenciados más de 700 genes *cry* (codificantes de las proteínas Cry) a partir de diversas cepas de *B. thuringiensis* y estos genes han sido expresados en diversos organismos como *Pseudomonas*, cianobacterias y plantas para el control de plagas agrícolas y de importancia sanitaria [4, 5]. Normalmente se encuentran en grandes plásmidos (DNA extracromosómico), aunque existen excepciones en las cuales se encuentran formando parte del cromosoma bacteriano. Los genes *cry* se expresan comúnmente en la fase estacionaria del ciclo celular de la bacteria y sus productos son acumulados en la célula madre formando la inclusión cristalina que representa entre un 20 a 30 % de peso seco de un cultivo esporulado [4].

Las proteínas Cry comprenden un grupo de proteínas relacionadas, que probablemente tengan una forma de acción similar en el insecto susceptible, independientemente de la cepa de *B. thuringiensis* de la cual provengan. Se ha comprobado que cuando la protoxina de 130-140 kDa es ingerida por una larva de un insecto susceptible, es solubilizada debido al alto pH (entre 8 y 10 en lepidópteros y dípteros) de su intestino medio, y posteriormente clivada por la acción de enzimas proteolíticas presentes en el interior del intestino del insecto. Este proceso da como resultado la liberación de una molécula de menor tamaño (que puede tener una masa molecular relativa, M_r , de entre 55-70 kDa). La toxina Cry3A, específica contra coleópteros, es sólo soluble a pHs mayores que 10 y por debajo de 4, mientras que las de tipo Cry1 (específicas contra lepidópteros) requieren un pH intestinal mayor de 8,9 para su óptima activación. La alcalinidad y la presencia de agentes reductores presentes en el intestino medio del insecto son los factores principales que contribuyen a la solubilización del cristal. La capacidad de solubilizar proteínas Cry a distintos pHs es una de las determinantes de la especificidad de acción de algunas toxinas. Para ejemplificar este hecho se pueden citar ciertas protoxinas con actividad potencial contra coleópteros que sólo son tóxicas después de una activación por solubilización *in vitro*, probablemente porque la protoxina es insoluble al pH intestinal neutro a ligeramente ácido de los coleópteros, tal es el caso de la toxina Cry1Ba [6]. Para algunas combinaciones insecto-proteína cristal el proceso proteolítico juega un papel significativo en la especificidad contra el insecto blanco.

Una vez que la toxina se ha activado, se une a una proteína de unión específica (el receptor) presente en las células epiteliales de las microvellosidades del





intestino medio, se inserta parcial o completamente dentro de la membrana, provocando la formación de poros, dando como resultado la lisis de las células del intestino medio, la disrupción de la integridad del intestino y la muerte del insecto [4].

La unión de las toxinas Cry a los receptores presentes en las células del epitelio del intestino medio del insecto susceptible es una determinante de la especificidad, la correlación entre esta unión y la toxicidad ha sido ampliamente demostrada en diversas especies de lepidópteros usando vesículas de las microvellosidades de las células intestinales (BBMV) desde las investigaciones reportadas por Wolfersberger en 1990 [7] hasta los trabajos más recientes [6]. Las principales proteínas propuestas como posibles receptores de las toxinas Cry1A en lepidópteros son una proteína de la familia de las caderinas (BtR) y la aminopeptidasa N (APN), que se encuentra anclada a la membrana a través de un grupo glicosilfosfatidil-inositol (GPI) [6]. Bravo y colaboradores [3] han demostrado que la interacción de algunas toxinas con la proteína caderina del insecto promueve un corte adicional del extremo amino terminal de la proteína Cry, esto facilitaría la formación de un oligómero o pre-poro formado por cuatro monómeros y sería responsable de la inserción a la membrana y finalmente a la formación del poro en la membrana intestinal. Para que el pre-poro se inserte a la membrana, se requiere la interacción con la APN. Experimentos en sistemas *in vitro* han demostrado en muchos casos una correlación entre la afinidad de unión de la toxina y la actividad insecticida, determinando que una alta toxicidad se corresponde con más cantidad de sitios de unión y mayor afinidad, y lo contrario para toxinas menos activas [8].

Las subespecies altamente tóxicas, registradas y utilizadas como componentes de formulados comerciales son muy limitadas. Entre ellas se incluyen las spp. *kurstaki*, *aizawai*, *israelensis* y *tenebrionis*. Por otra parte, los genes que se utilizan en la producción de plantas genéticamente modificadas se encuentran bajo patentes internacionales [9]. Por estas razones, a pesar de la gran cantidad y diversidad de proteínas descritas hasta el momento, la búsqueda de nuevas toxinas insecticidas sigue teniendo de gran interés en el área de la patología de los invertebrados. Por otro lado, aún existe un gran número de plagas que no pueden ser controladas por medio de las proteínas Cry conocidas. Finalmente, como únicamente han sido utilizadas algunas cepas de esta bacteria en la producción de formulados comerciales, se ha registrado el desarrollo de resistencias a campo por parte de las poblaciones de algunos insectos anteriormente





susceptibles a su acción. Por lo tanto, la obtención de nuevos aislamientos de *B. thuringiensis* que presenten toxinas diferentes a las ya descritas, es de gran interés comercial [10]. En este contexto, el objetivo de esta línea de investigación es el aislamiento y caracterización bioquímica, toxicológica y molecular de cepas nativas de *B. thuringiensis* altamente tóxicas contra insectos de importancia agrícola.

RESULTADOS OBTENIDOS

Los trabajos realizados por este grupo de investigación inicialmente se enfocaron hacia la generación de un banco de cepas, fuente de nuevas proteínas Cry [11]. Como resultado de ello, se aislaron 41 cepas nativas de *B. thuringiensis* (Fig. 1A), principalmente a partir de muestras de suelo y utilizando técnicas básicas de microbiología, obteniéndose una colección (FCC) que fue caracterizada morfológicamente, y por sus propiedades toxicológicas y genéticas. En particular, la caracterización toxicológica se ha realizado por medio de ensayos biológicos contra los lepidópteros y coleópteros plaga de cultivos como soja, maíz, tabaco, algodón y hortalizas, entre otros, *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatallis*, *Rachiplusia nu*, *Manduca sexta*, *Anthonomus grandis*, *Diabrotica speciosa* y *Tenebrio molitor* (Fig. 1 B-D). En cuanto a la caracterización genética, hemos desarrollado nuevas estrategias para comenzar el aislamiento y caracterización de nuevos genes codificantes de proteínas Cry (genes *cry*). Una de ellas basada en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y que utiliza cinco combinaciones diferentes de cebadores degenerados diseñados a partir de alineamientos de múltiples secuencias nucleotídicas de muy diversas toxinas Cry, además de reacciones de PCR anidada. Esta técnica fue validada con 13 cepas de referencia y permitió el inicio de la identificación de nuevos genes codificantes de proteínas Cry muy diversas filogenéticamente, tales como proteínas de tipo Cry8, Cry24 y tipo Cry9 [12, 13]. Por otro lado, para diferenciar diversas toxinas Cry presentes en una misma cepa desarrollamos una estrategia basada en la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) que utiliza algunos de los cebadores degenerados citados anteriormente y que nos permitió detectar diferencias entre las cepas analizadas [14]. A partir de estas y otras metodologías moleculares, como la amplificación asimétrica “Thermal Asymmetric InterLaced PCR”, TAIL-PCR [15] logramos caracterizar genes *cry* nativos, que han sido clonados y serán expresados en sistemas heterólogos



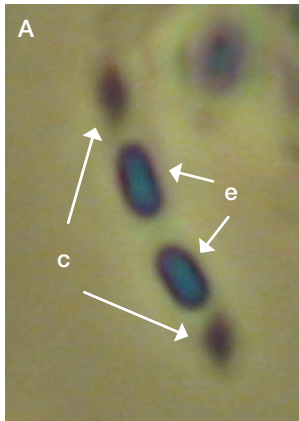


Figura 1. A) Cepa nativa de la bacteria *B. thuringiensis*; e, esporas, c, cuerpos paraesporales portadores de las proteínas Cry. B a D) Larvas del lepidóptero *R. nu*: en B), con signos de infección por bacteriosis, en C) larva sana en dieta artificial de cría en laboratorio, en D) larva sana en dieta natural.





para demostrar su actividad tóxica y posibles sinergismos con otras proteínas de esta familia. La caracterización bioquímica de las cepas bacterianas se realiza por medio de la determinación de las masas moleculares relativas de las proteínas presentes en ellas, utilizando la técnica de electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), así como su identificación por MALDI-TOF/TOF.

PERSPECTIVAS

Durante el desarrollo de esta línea de investigación se ha generado una colección de nuevos aislamientos de *B. thuringiensis*, a partir de los cuales se detectaron y caracterizaron nuevas secuencias codificantes de genes *cry*, con propiedades toxicológicas diferentes a las exhibidas por las cepas de uso comercial. A su vez, fueron desarrolladas estrategias novedosas para continuar caracterizando el contenido genético de nuevos aislamientos de *B. thuringiensis*. Se continuarán las actividades de caracterización bioquímica y molecular de secuencias codificantes de proteínas Cry, su expresión en sistemas heterólogos y su potencial uso como herramientas útiles para ser incorporadas dentro de las estrategias de Control Biológico de insectos actualmente utilizadas (insecticidas biológicos o diseño de genes sintéticos) y que se enmarcan dentro del Manejo Integrado de plagas.

OFERTA TECNOLÓGICA

Desde el año 2005, a través de la FIBA se vienen realizando convenios con empresas para el desarrollo de nuevos productos bioinsecticidas basados en nuevas cepas de *B. thuringiensis* y a partir de 2012 se realizan también Servicios Tecnológicos de Alto Nivel vinculados con el asesoramiento, evaluación y desarrollo de productos formulados a base de *B. thuringiensis* para el control de lepidópteros plaga. Se evalúa la calidad de los productos en cuanto a su crecimiento celular y desarrollo de cuerpos paraesporales en diversos medios de cultivo. Se realiza el asesoramiento en la elaboración de informes que son presentados ante entes regulatorios nacionales con el objetivo de obtener patentes de productos nacionales desarrollados a partir de cepas nativas de esta bacteria.





REFERENCIAS

1. Joung KB, Côte JC (2000) A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Horticultural Research and Development Center*. Technical bulletin N° 29. <http://res2.agr.ca/stjean/crdh.html>.
2. Gatehouse AM, Ferry N, Edwards MG, Bell HA (2011) Insect-resistant biotech crops and their impacts on beneficial arthropods. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 366(1569):1438–1452.
3. Bravo A, Likitvivatanavongb S, Gill SS, Soberón M (2011) *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol* 41(7):423–431.
4. Schnepf HE, Wong HC, Whiteley HR (1985) The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. *J Biol Chem* 260(10):6264–6272.
5. Crickmore N, Baum J, Bravo A, Lereclus D, Narva K, Sampson K, Schnepf E, Sun M, Zeigler DR (2014) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature <http://www.btnomenclature.info>.
6. Pigott CR, Ellar DJ (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev* 71(2):255–81.
7. Wolfersberger MG (1990) The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. *Experientia* 46(5):475–477.
8. de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17(4): 193–199.
9. Head GP, Greenplate J (2012) The design and implementation of insect resistance management programs for Bt crops. *GM Crops Food* 3(3):144–53.
10. Baxter SW, Badenes-Pérez FR, Morrison A, Vogel H, Crickmore N, Kain W, Wang P, Heckel DG, Jiggins CD (2011) Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in lepidoptera. *Genetics* 189(2):675–9.
11. Berón CM, Salerno GL (2006) Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina potentially useful in insect pest control. *BioControl* 51(6): 779–794.
12. Berón C, Curatti L, Salerno G (2005) New strategy for identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol* 71(2):761–765.





13. Berón CM, Salerno GL (2007) Cloning and characterization of a novel crystal protein from a native *Bacillus thuringiensis* isolate highly active against *Aedes aegypti*. *Curr Microbiol* 54(4):271-276.
14. Vidal Domínguez ME, Pérez-Cenci M, Salerno G, Berón CM (2011) Genetic Diversity of *cry* Gene Sequences of *Bacillus thuringiensis* Strains Analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Curr Microbiol* 62(3):866-870.
15. Liu YG, Whittier RF (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25(3):674-681.





2:

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL







CAPÍTULO 5

Análisis y generación de variabilidad genética en alpiste (*Phalariscanariensis* L.) a través del uso de herramientas biotecnológicas

Maximiliano Cogliatti

Facultad de Agronomía de Azul (FA-UNCPBA), Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB-AZUL). Centro de Investigaciones Integradas sobre Sistemas Agronómicos Sustentables (CIISAS). Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC-CONICET).

cmax@faa.unicen.edu.ar

RESUMEN

El alpiste es una gramínea anual de crecimiento invierno-primaveral, originario de la cuenca del Mediterráneo, que se cultiva para la producción de granos. Es considerado un verdadero cereal, con prácticas de producción, requerimientos y ciclo de cultivo semejantes a los de trigo. Actualmente, Argentina se encuentra entre los tres principales países productores de alpiste, con una concentración de su cultivo en la región centro y sudeste de la provincia de Buenos Aires.

Históricamente, los granos de alpiste han sido utilizados, casi con exclusividad, para la alimentación de aves ornamentales. Sin embargo, se han propuesto otros usos alternativos como la alimentación humana y de animales de cría como aves de corral y cerdos. Investigaciones orientadas a la utilización de los granos de alpiste como alimento humano, han revelado que los mismos poseen una composición única, son libres de gluten y altos en contenidos en triptófano.





Debido al interés regional del cultivo de alpiste, la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires recibe, desde el año 2001, el financiamiento de una empresa local para la ejecución de proyectos de investigación y desarrollo orientados a su mejoramiento genético y tecnológico.

Actualmente, el BIOLAB-AZUL tiene en ejecución el proyecto “Análisis y generación de variabilidad genética en alpiste (*Phalaris canariensis* L.) a través del uso de herramientas biotecnológicas” que incluye dos líneas de investigación: la primera está orientada a la generación de variabilidad genética de utilidad para el mejoramiento genético de la especie, a través de mutagénesis inducida con azida sódica y rayos gamma. Con esta técnica se busca la obtención de: a) genes de enanismo, para el desarrollo de cultivares de alpiste resistentes al vuelco, b) genes de precocidad, para el desarrollo de cultivares capaces madurar anticipadamente permitiendo la liberación temprana de los lotes, y c) genes de resistencia a herbicidas, para el desarrollo de cultivares de alpiste que permitan un mejor control de malezas. La segunda línea de investigación está dirigida a la diferenciación de cultivares comerciales de alpiste, a través del empleo de marcadores moleculares ISSR (amplificación de fragmentos situados entre secuencias repetitivas simples) y SNPs (polimorfismos de nucleótidos simples).

INTRODUCCIÓN

El alpiste (*Phalaris canariensis* L.) es una gramínea anual, de crecimiento invierno-primaveral, originaria de la cuenca del Mediterráneo, que se cultiva para la producción de granos (Fig. 1). Es una especie diploide ($2n=2x=12$) [1], preponderantemente autógama [2], cuyas prácticas de producción, requerimientos y ciclo de cultivo, se asemejan a los del trigo y cebada.

Se conoce como cereales menores de invierno a aquéllos que, en forma separada, tiene una relevancia económica menor que el trigo pan (*Triticum aestivum*). A este grupo pertenece el alpiste, y otros como la avena (*Avena sativa*), la cebada (*Hordeum vulgare*), el centeno (*Secale cereale*), el trigo candeal (*T. durum*) y el triticale (*x Triticocercle*).

Los granos de alpiste han sido utilizados, casi exclusivamente, para la alimentación de aves ornamentales [3]. Sin embargo, se han propuesto otros usos alternativos como la alimentación de cerdos [4], aves de corral [5] y la elaboración de alimentos “libres de gluten” para consumo humano [6].



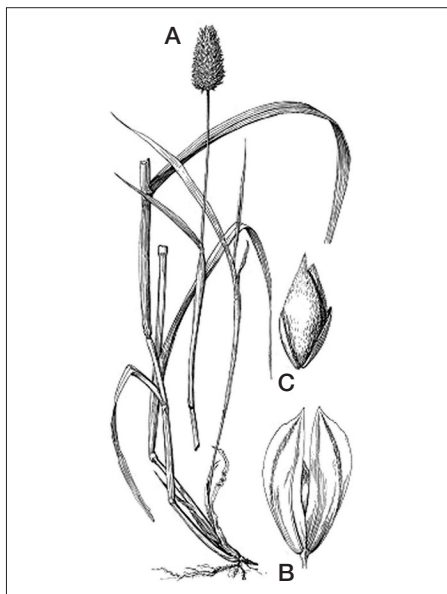


Figura 1. Ilustración de la planta de alpiste.

A) panoja; B) espiguilla;
C) grano.

(USDA-NRCS, 2013)".

A nivel mundial el alpiste es considerado un cultivo menor o alternativo, con una producción anual que ronda las 250.000 toneladas y un rendimiento promedio de aproximadamente 1.000 kg/ha [7]. Hasta 1980, la Argentina fue el principal productor y exportador mundial de granos de alpiste, lugar que hoy ocupa Canadá [7]. Actualmente, nuestro país se encuentra entre los tres principales países productores de alpiste, situándose el grueso del área de producción en el centro y sudeste de la provincia de Buenos Aires [8].

Los esfuerzos dedicados al mejoramiento genético y tecnológico del cultivo de alpiste en nuestro país han sido insuficientes, redundando en la inexistencia de cultivares comerciales nacionales [9]. Al respecto, lo que se siembra en la Argentina son poblaciones de origen genético desconocidos, que exhiben una marcada homogeneidad en cuanto a su morfología, fenología y productividad [10]. Si bien las poblaciones presentan cierta adaptación a nuestras condiciones agroecológicas, poseen una maduración desuniforme, bajos rendimientos, granos pequeños y una marcada tendencia al vuelco; entre otros





rasgos mejorables [11]. A nivel mundial existen alrededor de una docena de cultivares de alpiste (“Cantate”, “Juditá”, “Lizard”, “Karcusu”, “Abad”, “Aldén”, “Elias”, “Keet”, “CDC-María”, “CDC-Togo”, “CDC-Bastia”) con escasa o nula adopción en nuestro país. En los años 2004, 2005 y 2006, fueron evaluados agrónomicamente, en Azul, 57 accesiones de alpiste (47 poblaciones y 10 cultivares) originarios de 19 países. Como resultado se observó escasa variabilidad para caracteres como el rendimiento en grano, susceptibilidad al vuelco y duración del ciclo del cultivo [11].

Actualmente, está en ejecución el proyecto “Análisis y generación de variabilidad genética en alpiste (*P. canariensis* L.) a través del uso de herramientas biotecnológicas”. El mismo incluye dos líneas de investigación: la primera orientada a la generación de variabilidad genética a través de mutagénesis inducida, con la finalidad de obtener : a) genes de enanismo, para el desarrollo de cultivares de alpiste resistentes al vuelco, b) genes de precocidad, para el desarrollo de cultivares capaces madurar anticipadamente permitiendo la liberación temprana de los lotes, y c) genes de resistencia a herbicidas, para la obtención de cultivares de alpiste que permitan un mejor control de malezas. La segunda línea de investigación, está dirigida a la diferenciación de cultivares comerciales de alpiste, a través del empleo de marcadores moleculares.

HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS APLICADAS A LA LÍNEA DE TRABAJO

Generación de variabilidad genética través de mutagénesis inducida

La mutagénesis inducida ha sido una de las herramientas biotecnológica más empleadas para la generación de variabilidad genética en el mejoramiento genético vegetal [12]. Su principal ventaja radica en la posibilidad de mejorar uno o unos pocos caracteres sin modificar el resto del genotipo, permitiendo generar rasgos específicos ausentes en la especie a mejorar. De acuerdo a la base de datos de la FAO/IAEA [12] para el año 2000 existían 2.252 cultivares obtenidos por mutagénesis inducida, los cuales fueron liberados oficialmente en 59 países de todo el mundo, principalmente en Asia (1.142), Europa (847) y América del Norte (160). Entre ellos se incluyen muchos cultivos importantes como arroz, trigo, algodón, colza y girasol. Específicamente en alpiste, los caracteres “semilla glabra” y “color amarillo del pericarpio” han sido obteni-





dos por mutagénesis química con azida sódica [13]. De las 2.252 variedades, el 75% (1.700) corresponden a cultivos extensivos y el resto (552) a especies ornamentales. Asimismo, alrededor del 70% de las variedades con caracteres obtenidos por mutagénesis inducida, fueron seleccionadas y liberadas en forma directa, y el 30% restante se obtuvieron por selección de genotipos recombinantes, provenientes de cruzamientos con individuos mutantes.

Los agentes mutagénicos (mutágenos) utilizados en el mejoramiento genético vegetal se pueden clasificar, según su naturaleza, en dos grandes grupos: físicos o químicos. Entre los agentes físicos más empleados están los distintos tipos de radiaciones ionizantes como los rayos X, los rayos gamma y los neutrones. Los tratamientos mutagénicos con rayos gamma han sido los más utilizados, debido a su simplicidad. El proceso de la irradiación es breve, el material tratado no es radioactivo y se puede utilizar directamente para la siembra o plantación. En general, las semillas u otros órganos de la planta son enviados a centro nucleares para su irradiación con rayos gamma [14].

Existen numerosos mutágenos químicos, entre los más utilizados están: etil metano sulfonato (EMS), metil metano sulfonato (MMS), dietil sulfato (DES) y azida sódica (NaN_3) [14].

Con el propósito de generar individuos mutantes con genes que les confieran diferentes grados de precocidad, enanismo y resistencia a herbicidas, se procedió a realizar los siguientes tratamientos mutagénicos sobre semillas de alpiste.

Material vegetal

Los tratamientos mutagénicos se realizaron sobre semillas del cultivar canadiense “CDC-Togo”. Dicho cultivar fue evaluado en la Chacra Experimental de la Facultad de Agronomía de Azul (CEFA-UNCPBA), durante los años 2011, 2012 y 2013, exhibiendo buen rendimiento, producción de granos glabros, elevado peso de mil granos y un adecuado comportamiento sanitario (datos no publicados).

Tratamientos mutagénicos

Tratamientos con azida sódica: tres muestras de aproximadamente 62.500 semillas (500 g) fueron tratadas en solución de azida sódica 0,5, 1 y 2 mM, respectivamente.





Tratamientos con rayos gamma: cuatro muestras de aproximadamente 250.000 semillas (2.000 g) fueron irradiadas con rayos gamma a 50, 150, 250, y 350 Gy, respectivamente. Los tratamientos de irradiación fueron realizados en el Centro Atómico Ezeiza (CAE), perteneciente a la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA).

Todos los tratamientos fueron sembrados en la CEFA-UNCPBA, en el 2013, para conformar las poblaciones mutantes M_1 . Las siete poblaciones M_1 fueron cosechadas individualmente y sembradas en el 2014, dando origen a las respectivas poblaciones M_2 . Sobre las plantas de la población M_2 se comenzará el proceso de selección de genotipos con diferentes grados de precocidad y enanismo. Las semillas provenientes de las plantas no seleccionadas de la M_2 , serán sembradas en 2015 para conformar la población M_3 , sobre la cual se realizarán las pruebas de tolerancia a herbicidas.

Diferenciación de genotipos de alpiste a través del empleo de marcadores moleculares

La identificación genotípica es indispensable para el seguimiento de los cultivares a través de los procesos de multiplicación y comercialización. En alpiste, la presencia de pilosidad en las coberturas de los granos permite distinguir entre cultivares pilosos y glabros. El problema reside en las dificultades que existen para diferenciar los distintos cultivares dentro de cada grupo, debido a las semejanzas que presentan en cuanto a su morfología y fenología.

Con el objeto de ajustar una técnica que permita una adecuada identificación genotípica entre cultivares de alpiste, se utilizarán marcadores moleculares tipo ISSR (“inter simple sequence repeat” o amplificación de fragmentos situados entre secuencias repetitivas simples) y desarrollarán marcadores tipo SNPs (“Single Nucleotide Polymorphism” o polimorfismos de nucleótidos simples) por GBS (“Genotyping by Sequencing” o Genotipado por Secuenciación).

Material vegetal: serán caracterizados los siguientes 10 cultivares de alpiste (“Cantate”, “Judita”, “Lizard”, “Karcsu”, “Abad”, “Aldén”, “Elias”, “Keet”, “CDC-María” y “CDC-Togo”) y tres líneas experimentales (“Kisvardai-41”, “4202” y “4203”).



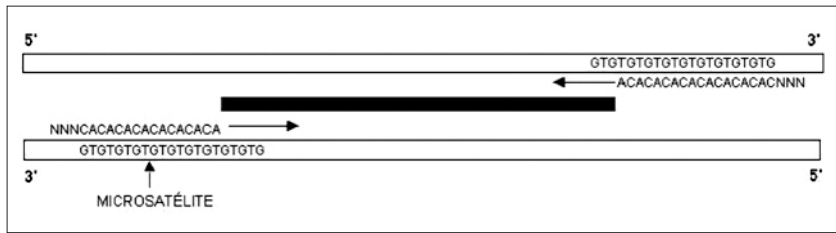


Figura 2. Amplificación con un cebador(CA)_n anclado en el extremo 5' con tres nucleótidos extras. Se amplifica el segmento intermedio entre dos secuencias de microsatélite en orientación invertida [16].

ISSR

Los ISSRs son marcadores moleculares que comprenden el uso de secuencias microsatélites como cebadores, en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para generar marcadores multilocus. Esta técnica es relativamente simple, rápida, económica y robusta. Debido a que los ISSRs son marcadores altamente polimórficos, se utilizan en estudios de diversidad genética, filogenia, etiquetado de genes, cartografía del genoma, en biología evolutiva y para la identificación de genotipos [15, 16].

Esta metodología tiene como ventajas su elevada capacidad de detectar variaciones, su alta reproducibilidad y las bajas concentraciones de DNA requeridas. Asimismo, para diseñar los cebadores no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio.

Los ISSRs amplifican regiones no repetitivas del DNA situadas entre secuencias microsatélites. Los microsatélites son regiones del DNA que consisten en repeticiones en tándem de motivos simples, como (CT)_n ó (CA)_n. Cuando dos microsatélites se presentan dentro de una distancia amplificable y con una orientación invertida, el cebador complementario a ellas puede inducir la amplificación del segmento de DNA ubicado entre ambos. Los cebadores de ISSRs consisten en un motivo repetido de di- o tri-nucleótidos complementario a la secuencia del microsatélite (Fig. 2). Eventualmente, a la secuencia de los cebadores puede agregarse un par de nucleótidos extras, arbitrarios, en el extre-



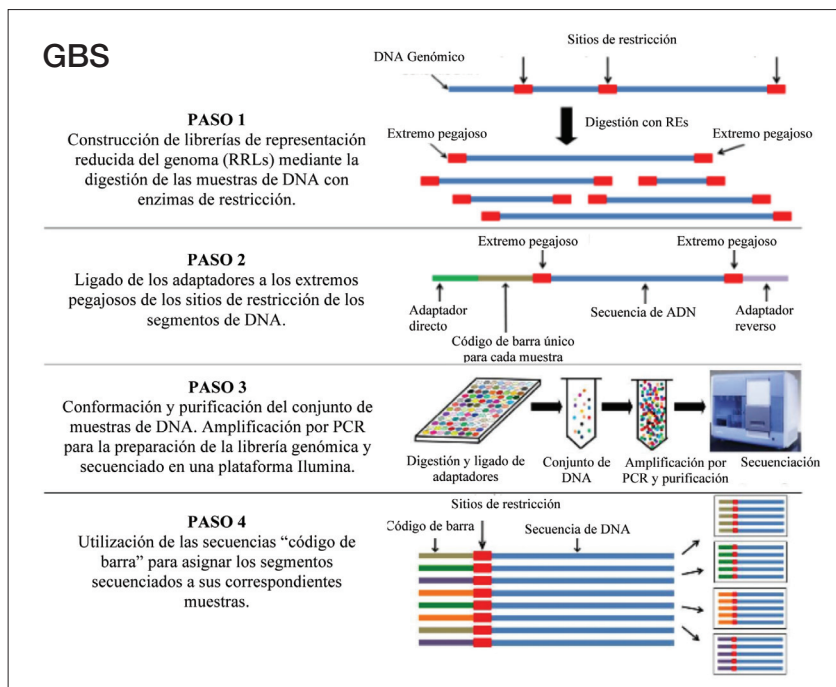


Figura 3. Esquema de la técnica de Genotipado por Secuenciación (GBS). Adaptado de Troggio, 2014 [19].

mo 3' o en el 5', que oficiarán de “anclas” asegurando así que la amplificación inicie siempre en el extremo 5' o en el 3' del microsatélite, respectivamente[15]. Los segmentos generados se consideran un “locus” y pueden visualizarse como bandas en geles de agarosa o poliacrilamida. Se ha observado que los ISSRs frecuentemente amplifican de 25 a 50 bandas en una sola reacción. Este patrón característico de productos de PCR se considera la “huella digital genética” o “fingerprint” de cada uno de los individuos analizados. Esta técnica permite identificar polimorfismos entre individuos de la misma especie debido a que el análisis es sensible a la presencia/ausencia del elemento genómico reconocido por el cebador y a la longitud de las secuencias intermedias amplificadas [17].





GBS

GBS es un método de secuenciación genómica de baja cobertura [18] que ha sido utilizado exitosamente para la caracterización genotípica y obtención de marcadores moleculares tipo SNPs, en diferentes especies vegetales.

La técnica comienza con la extracción y posterior normalización de DNA, para asegurar que todas las muestras a secuenciar contengan la misma cantidad de DNA. Las muestras normalizadas son digeridas con enzimas de restricción (REs) que realizan cortes en regiones específicas del DNA, permitiendo la obtención de la secuencias de representación reducida del genoma (RRL). Para evitar la secuenciación de intrones, se utilizan REs sensibles a las regiones metiladas que permiten excluir las regiones DNA que contienen secuencias altamente repetitivas [18].

En los extremos de los segmentos resultantes de la digestión del DNA “extremos pegajosos” se ligan adaptadores, que son oligonucleótidos que cuentan con: i) la secuencias de reconocimiento de los sitios de restricción, ii) la secuencia de los oligonucleótidos necesarios para el inicio de amplificación por PCR, y iii) la secuencia complementaria al oligonucleótido que se encuentra unido a la celda de flujo del secuenciador. Además, uno de los adaptadores (directo) lleva una secuencia específica de bases denominada “código de barras” que es luego utilizada para la asignación de los segmentos secuenciados a las correspondientes muestras. Finalizado el proceso de digestión y ligado de adaptadores, se genera un conjunto de muestras, que contiene cantidades equitativas de cada una, y se procede a la purificación del mismo para eliminar los adaptadores sobrantes y segmentos de DNA de tamaño reducido. El conjunto de muestras es amplificado por PCR, nuevamente purificado, y secuenciado en una plataforma Illumina. Los datos resultantes son analizados con software informáticos específicos. En la figura 3 se muestra los pasos implicados en esta metodología.

PERSPECTIVAS

El proyecto “Análisis y generación de variabilidad genética en alpiste (*P. canariensis* L.) a través del uso de herramientas biotecnológicas” tiene como propósitos la obtención de genotipos con rasgos de interés agronómicos ausentes en la especie y la identificación genotípica a través del uso de marcado-





res moleculares. Dicho proyecto está integrado al programa de mejoramiento genético del cultivo de alpiste, vigente desde el año 2001, que tiene como finalidad la obtención de cultivares comerciales.

La presente línea de trabajo está enfocada a la resolución de dos problemas prácticos concretos, la incorporación de nuevas características agronómicas a un cultivo y la identificación genotípica, haciendo uso de herramientas biotecnológicas apropiadas.

OFERTAS TECNOLÓGICAS

El BIOLAB-AZUL posee los recursos técnicos necesarios para trabajar en el mejoramiento genético de especies vegetales, mediante la aplicación de métodos tradicionales y biotecnológicos.

Dado el interés regional de este cultivo el BIOLAB-AZUL recibe, desde el año 2001, financiamiento externo para la ejecución de proyectos de investigación y desarrollo orientados al mejoramiento genético y tecnológico de la especie, a través de la suscripción de un convenio entre la Facultad de Agronomía (UNCPBA) y una empresa local.





REFERENCIAS

1. Bennett MD, Smith JB (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil Trans R Soc Lond B* 274:227-274.
2. Matus-Cádiz M, Hucl P (2006) Outcrossing in annual canarygrass. *Can J Plant Sci* 46:243-246.
3. Coscia AA, Castedo AV (1967) El Alpiste, grano de especulación. Informe Técnico N° 70. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).
4. Thacker P (2003) Performance and carcass characteristics of growing-finishing pigs fed diets containing graded levels of canary seed. *Can J Anim Sci* 83(1):89-93.
5. Newkirk RW, Ram JI, Hucl P, Paterson CA, Classen HL (2011) A study of nutrient digestibility and growth performance of broiler chicks fed hairy and hairless canary seed (*Phalaris canariensis* L.) products. *Poultry Science* 90:2782-2789.
6. Patterson CA (2011) Canaryseed - Naturally Gluten-Free. *Canaryseed News* 21:4.
7. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2014) Base de datos estadísticos integrada. On-line. <http://faostat.fao.org>.
8. Alpiste (2011) Bolsa de Cereales de Buenos Aires/ Número estadístico 2009-2010. 106-111.
9. INASE (Instituto Nacional de Semillas) (2014) Catálogo Nacional de Cultivares. On-line: http://www.inase.gov.ar/index.php?option=com_remotory&Itemid=103&func=select&id=14
10. Bodega JL, De Dios MA, Rodríguez RH, Pereyra Iraola M (1995) Caracterización agronómica de poblaciones comerciales de alpiste. *Revista Facultad de Agronomía* 15:161-170.
11. Cogliatti M, Bongiorno F, Dalla Valle H, Rogers WJ (2011) Canaryseed (*Phalaris canariensis* L.) accessions from nineteen countries show useful genetic variation for agronomic traits. *J Plant Sci* 91:1-12.
12. FAO / IAEA (Food and Agriculture Organization of the United Nations/ International Atomic Energy Agency). FAO/IAEA Mutant Variety Database (MVD) (2014) On-line: <http://mvgs.iaea.org/AboutMutantVarieties.aspx>.
13. Matus-Cádiz MA, Hucl P, Vandenberg A (2003) Inheritance of hull pubescence and seed color in annual canarygrass. *Can J Plant Sci* 83:471-474.





14. Maluszynski M, Szarejko I, Bhatia CR, Nichterlein K, Lagoda PJJ (2009) Methodologies for generating variability. Part 4: Mutation techniques. Plant breeding and farmer participation. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Rome, 2009. 687 p.
15. Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9–17.
16. González A, Aguirre X (2007) Capítulo 19. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología. México. 608 p.
17. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176–183.
18. Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, Blaxter ML (2011) Genome- wide genetic marker discovery and genotyping using next -generation sequencing. *Nat Rev Genet* 12:499–510.
19. Troggio M (2014) Genomic approaches for discovering genes controlling complex traits. Edmund Mach Foundation San Michele all'Adige, Trento, Italy. on-line: <http://www.tgac.ac.uk/uploads/Training%20Events/SeqA-head%20Training%20Course%20Materials/Interpreting%20Genomic%20Data.pdf>.





CAPÍTULO 6

Caracterización genotípica, fenotípica y metabolómica de calidad, rendimiento y adaptación en trigo asociado al cambio climático

Silvana Marisol Luján Basile¹, María Cecilia Peverelli¹,
Horacio Dalla Valle¹, Jorge Alberto Tognetti², William John Rogers¹

¹BIOLAB AZUL (CIC-PBA, CONICET, CIISAS, Facultad de Agronomía, Azul, UNCPBA), Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC-CONICET), y Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), Mar del Plata, Argentina.

²UI Balcarce, CIC-PBA.

marisol_basile@yahoo.com.ar

RESUMEN

En trigo, caracteres de interés agronómico como calidad, rendimiento y adaptación a distintos ambientes, se explican desde los componentes genéticos, ambientales y también desde la interacción genotipo-ambiente. En un escenario de cambio climático, se modifica el efecto de estos componentes sobre los caracteres mencionados, entre otros. Resulta imprescindible conocer qué subyace en la determinación de estos caracteres para poder mejorarlos, más aún, teniendo en cuenta los ambientes futuros a los que se someterá el cultivo. El objetivo de este grupo de trabajo, es evaluar con ensayos en campo y en cámaras climatizadas, el comportamiento de diferentes cultivares de trigo pan y candeal, frente a estreses ambientales asociados al cambio climático, como lo





es el estrés por alta temperatura en la etapa de llenado de grano y en plántulas, y en relación con el status nitrogenado.

La evaluación contempla el relevamiento de variables fenotípicas asociadas a calidad, rendimiento y adaptación, cuantificación del daño celular, determinación de los metabolitos presentes en exudados floemáticos y en granos, y cuantificación y caracterización de las proteínas presentes en el gluten, las cuales son las principales responsables de la calidad panadera.

Se pretende aportar conocimiento sobre los principales efectos del estrés térmico en los caracteres mencionados y, de ser posible, encontrar metabolitos de estrés y de calidad, que permitan actuar como marcadores bioquímicos en la selección de cultivares. Además, se buscan genes asociados a calidad, rendimiento y adaptación mediante el mapeo por asociación, que se basa en el desequilibrio por ligamiento. De este modo, se pretende caracterizar desde varios enfoques, el efecto del estrés térmico por alta temperatura sobre los componentes de calidad panadera, rendimiento y adaptación en trigo, en pos de aportar en la selección de cultivares tolerantes y de buena calidad.

Hasta el momento, se han encontrado en los exudados floemáticos, masas metabólicas que difieren significativamente entre cultivares, como así también, entre los distintos grupos de calidad panadera. Se está avanzando en la identificación de esas masas dentro de un conjunto de metabolitos candidatos. También se conocen las combinaciones alélicas de gluteninas y algunas gliadinas, que contribuyen a aumentar el *score* de calidad panadera. Se va a relevar cuales de estas variantes están presentes en la población bajo estudio y como es su comportamiento bajo estrés térmico. Además, por mapeo por asociación, se han encontrado asociaciones significativas entre genes candidatos y algunas de las variables fenotípicas medidas.

Entre la oferta tecnológica que desarrolla este grupo se puede mencionar: determinación de las variantes alélicas de gluteninas y gliadinas por geles de poliacrilamida en una dimensión; estudios asociativos de componentes de rendimiento, adaptación y calidad en trigo; determinación del perfil metabolómico presente en muestras de exudados floemáticos y del daño oxidativo.





INTRODUCCIÓN: ASPECTOS GENERALES DE LA LÍNEA DE ESTUDIO

La producción mundial total de trigo se mantiene en crecimiento desde hace décadas, rondando en el año 2013 los 700 millones de toneladas [1], siendo Argentina uno de los principales países productores. Se estima que en la campaña 2013/14 sobre 3.648.070 hectáreas sembradas de trigo pan (*Triticum aestivum* L.), se obtuvieron unos 9.188.339 de toneladas [2]. Por el contrario, la superficie sembrada en el país con trigo candeal (*Triticum durum* Desf.) viene en retroceso. Actualmente la superficie sembrada es de unas 65.000/80.000 hectáreas, lo cual alcanza principalmente para cubrir el abastecimiento local de pastas tipo Premium y para generar alguna exportación puntual y de muy escaso volumen [2].

Desde hace unos años, el mercado agrícola mundial se enfrenta a escenarios que demandan mayor cantidad y calidad en la producción. Calidad es un concepto que depende del destino final de uso, es una noción dinámica, que evoluciona constantemente debido a las nuevas exigencias, aplicaciones y medios. Por ello, es de suma relevancia apuntar a la diferenciación de harinas de distintas calidades en pos de fines específicos. Esto permitirá aumentar el valor agregado a la producción e ingresar a mercados más exigentes, con el consecuente incentivo en la producción local.

Debido a la fuerte interacción entre ambiente y calidad industrial sería muy conveniente sembrar los cultivares de trigo en las áreas más adecuadas para su producción, lo cual aprovecharía el efecto ambiente y facilitaría la clasificación de las harinas, semejante a lo que ocurre con el trigo australiano. En Argentina, por ejemplo, hay una tendencia a que las regiones trigueras IV y V presenten más cantidad de cultivares del grupo I, (alrededor del 50 % de la producción de esta región), en comparación con otras regiones. Además, la región IV suele ser una de las de mayor rinde.

Disgregar por calidad en base al uso final del producto permitiría obtener una uniformidad en los stocks harineros, que sería más acorde con la automatización de los procesos industriales, la calidad final del producto y la aceptación por parte de consumidor.





CALIDAD EN TRIGO PAN

Los trigos panes argentinos se clasifican provisoriamente por su capacidad de uso final, en tres grupos de calidad:

- **Grupo 1:** trigos correctores, aptos para la panificación industrial.
- **Grupo 2:** trigos para panificación tradicional, aptos para fermentaciones largas (mayores a 8 hs.).
- **Grupo 3:** trigos para panificación directa, fermentaciones cortas, menores de 8 hs.

Las características de calidad buscadas incluyen: contenido de proteína superior al 11,5 % (lo cual da idea del contenido de gluten, pero no de su calidad), buen contenido y fuerza de gluten, adecuada viscoelasticidad de la masa (definida por la relación entre gluteninas y gliadinas), adecuados parámetros del alveógrafo W (área bajo la curva que indica fuerza panadera), P/L (relación que da idea del equilibrio de la masa), alto volumen de pan, bajo contenido de cenizas (vinculado a la uniformidad de la molienda), alto peso hectolítrico (asociado al rendimiento harinero), alto rendimiento harinero y estabilidad farinográfica, *falling number* superior a 250 segundos (valores inferiores dan idea de grano brotado).

El gluten es el principal responsable de la utilización de las harinas de trigo en la panadería. Se obtiene mediante la acción mecánica de lavar las harinas con agua, perdiéndose así las proteínas hidrosolubles y el almidón. Se logra así, una sustancia visco-elástica y pegajosa, constituida por proteínas insolubles en agua (gliadinas y gluteninas). Las gliadinas están asociadas a la extensibilidad de la masa y las gluteninas asociadas a la viscoelasticidad. Estas últimas son las responsables de formar los polímeros de proteína no extractable (UPP), que han sido vinculados con la tolerancia a estrés abiótico [3].

CALIDAD EN TRIGO CANDEAL

El trigo candeal constituye la materia prima ideal para la elaboración de pastas secas dentro del segmento de alta calidad o pastas Premium. El grano posee un balance óptimo entre tenacidad y extensibilidad, logrando formar una red fibrosa y elástica, que evita las deformaciones durante el secado de las pastas y también una mayor resistencia a la cocción, minimizando la extracción de almidón y por ende el “pegado” de los productos.





Las características de calidad buscadas incluyen vitreosidad por encima del 70 % (ligada al porcentaje de proteína, granulación de las sémolas y color amarillento de las mismas), dureza, color amarillo de las sémolas (determinado por los betacarotenos, –recomendable más de 8 ppm), adecuado índice de gluten y estabilidad en el farinograma. Actualmente, existen algunas bonificaciones por porcentaje de gluten, de proteína y de vitreosidad, entre otros.

Tanto en trigo pan como en candeal, muchos de los parámetros de calidad se basan fundamentalmente en la composición alélica de las proteínas del gluten, pero sufren también el efecto del ambiente y de la interacción genotipo-ambiente.

AMBIENTE Y CALIDAD

El ambiente afecta la expresión cuantitativa de la calidad, la cual viene determinada por el genotipo. Influye en la sanidad del cultivo, el porcentaje de proteína del grano, la polimerización de los gránulos de almidón, el daño del grano a la cosecha, la humedad final del grano, el color de la sémola y el porcentaje de vitreosidad.

La región triguera argentina se ha caracterizado por tener condiciones climáticas que permitían el mayor potencial productivo en granos. En un contexto de cambio climático, es necesario evaluar los efectos actuales y futuros que este fenómeno tendrá sobre la calidad del trigo en la región. El impacto reciente de este fenómeno incluye muy probablemente menor frecuencia de días y noches frías y de heladas, como mayor frecuencia de días y noches cálidas. También probablemente mayor frecuencia de las olas de calor que además ocurrirían sobre superficies más extensas e incrementos en la incidencia de niveles extremos en la altura del nivel del mar, y en algunas regiones, incrementos del área global afectada por sequía (desde 1970) y de la actividad ciclónica tropical intensa en el Atlántico norte [4].

De todos estos efectos, este grupo de trabajo se centra en la caracterización del estrés térmico al que se ve y se verá afectado en las próximas décadas, el cultivo de trigo. De acuerdo a los distintos modelos analizados por el Panel Intergubernamental de Cambio Climático (IPCC), se prevé un incremento de la temperatura media global de 0,3 °C–1,7 °C (con una media de + 1 °C) en los escenarios más favorables y de 2,6 °C– 4,8 °C (con una media de + 3,5 °C) en los escenarios más complicados, para el período 2081–2100 en comparación





con el período 1986–2005. Estos incrementos serán más pronunciados en el Ártico y sobre la superficie terrestre, con respecto a los océanos [5].

El crecimiento de las plantas es muy sensible a la temperatura, cambios de pocos grados centígrados conllevan a cambios significativos en la tasa de crecimiento. El daño que se ocasione por un determinado estrés depende del tipo de estrés, su duración e intensidad, si está o no presente junto a otros estreses, del estado fisiológico del cultivo, como del estado nutricional y sanitario del mismo. Cuando se habla de estrés térmico por altas temperaturas, se pueden distinguir dos tipos de regímenes que afectan a los cultivos:

- temperaturas moderadamente altas durante todo un período del cultivo. Por ejemplo, un aumento de 25 a 32 °C durante el período de llenado de granos; o bien
- breves períodos de 3 a 5 días de muy altas temperaturas (33 a 40 °C) [6].

En el caso del llenado de granos en trigo o cebada, el estrés térmico por breves períodos resultó ser más perjudicial sobre el peso y la composición de proteínas que el aumento sostenido en el tiempo de las temperaturas [6]. Naeem y MacRitchie [3] y Don *et al.*, [7] encontraron que temperaturas superiores a 30 °C durante el llenado de granos van en detrimento de la calidad industrial. También Naeem y MacRitchie [3] encontraron que germoplasma con elevado % UPP (“*unextractable polymeric protein*”) acumulado al momento de sufrir el estrés térmico, muestra un grado de tolerancia para calidad.

A nivel planta, en la etapa de llenado de granos, las altas temperaturas disminuyen el peso de los granos por:

- acortamiento del período de llenado;
- disminución del área foliar o incremento de la tasa de senescencia foliar. Esto reduciría los asimilados disponibles, pero no se ha demostrado que sean limitantes para el llenado con altas temperaturas, y,
- efecto directo en la capacidad de crecer del grano, al actuar sobre las enzimas termosensibles de la síntesis de almidón [7].

Si evaluamos lo que ocurre a nivel de las células vegetales, las altas temperaturas desestabilizan las membranas celulares al disminuir la fuerza de los puentes hidrógeno y de las interacciones electrostáticas entre los grupos polares de las proteínas. Esto produce cambios en la fluidez (viscosidad) de las membranas, afectando procesos claves como respiración y fotosíntesis. También se produce





la disipación de gradientes de concentración, los cuáles son esenciales para el normal funcionamiento celular y dependen del deterioro directo o indirecto de la ATPasa por las altas temperaturas.

El estrés oxidativo es una respuesta que se da frente a temperaturas extremas, pero que también es común a varios estreses como sequía, salinidad, contaminantes, interacciones bióticas que desencadenan una respuesta hipersensible, entre otros. Este estrés se da cuando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) excede su consumo. Los radicales libres provocan la peroxidación de lípidos, la desnaturalización de proteínas, la mutación del DNA y la inhibición de la fotosíntesis entre otros, con la consecuente descompartimentalización y muerte celular. La peroxidación lipídica es considerada el proceso que mayor daño produce en los organismos vivos y puede ocurrir por rutas enzimáticas y por radicales libres. Durante la peroxidación lipídica, se forman productos derivados de precursores poli-insaturados. Algunos de estos componentes reaccionan con el ácido tiobarbitúrico para formar productos coloreados llamados sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). La peroxidación lipídica tanto de la membrana de la célula o de las organelas, se lleva a cabo cuando los niveles de ROS sobrepasan el umbral alcanzado por las sustancias reactivas al oxígeno no afectando solamente el normal funcionamiento celular sino también agravando el estrés oxidativo mediante la producción de radicales derivados de lípidos [8].

Por todo lo antes dicho los objetivos de este grupo son:

- Aportar a la caracterización del efecto del estrés térmico en la etapa de llenado de granos de trigo pan, ya que lo que suceda en este estadio estará directamente relacionado con la calidad final del producto. Por lo tanto, se estudia el efecto de temperaturas moderadamente altas durante el llenado de granos, por medio de ensayos en dos localidades contrastantes en la temperatura diaria como son Azul en la Provincia de Buenos Aires y Marcos Juárez en la Provincia de Córdoba. Además, se han realizado ensayos donde el estrés térmico se aplicó como breves períodos de altas temperaturas, a campo –con carpas de polietileno– y en cámaras climatizadas. Se busca caracterizar el efecto del estrés térmico sobre la calidad panadera en pos de seleccionar genotipos tolerantes para calidad bajo estrés térmico. Se analiza el efecto del estrés desde los metabolitos presentes en los exudados floemáticos y en los granos, desde la composición de las proteínas del gluten y desde el mapeo por asociación.





- Aportar a la caracterización del efecto de un golpe de estrés térmico en el estadio de plántulas en trigo candeal. Se busca así, evaluar el daño celular al aplicar estrés térmico en cámaras climatizadas, en pos de desarrollar estrategias que permitan la reducción de los efectos negativos. Se analiza el efecto del estrés desde las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico presentes en tejido vegetal.

Herramientas biotecnológicas aplicadas a la línea de estudio

Determinaciones de componentes de rendimiento y adaptación: En ensayos llevados a cabo en cámaras climatizadas y a campo se determinan fecha de espigazón, anthesis y madurez, duración del llenado, altura planta y altura espiga, biomasa fresca, biomasa seca, peso de mil granos, índice de cosecha, índice de fertilidad de la espiga, % de proteína, entre otros.

Caracterización de subunidades proteicas a través de geles de poliacrilamida de 1 dimensión en presencia de duodecil sulfato sódico (SDS-PAGE): Se realiza la extracción secuencial de las gliadinas y gluteninas presentes en las muestras de harinas de los diferentes ensayos, de acuerdo al protocolo de Gupta y MacRitchie [9]. Muchas de las sub-unidades de gluteninas y algunas de las de gliadinas, están caracterizadas y se pueden reconocer fácilmente en los geles gracias a la comparación con un marcador proteico, como es el cultivar “Chinese spring” u otros marcadores de uso comercial que permiten también la cuantificación de la cantidad de proteína.

Determinación del perfil de metabolitos presente en exudados y granos por ESI-MS-TOF: La recolección de exudados se realiza de acuerdo a la técnica de Caputo y Barneix [10] y en el momento en que la hoja bandera está totalmente expandida en más del 50 % de la parcela. Los exudados se someten a espectrometría de masas por tiempo de vuelo (TOF-MS), previa ionización con electrospray (ESI) con el equipo Applied Systems/MDS Sciex hybrid quadropole time-of-flight Q-Star Pulsar-i.

Determinación del daño oxidativo: Un homogenato de hojas se obtiene por maceración con ácido tricloroacético (TCA). La determinación de la peroxidación se realiza de acuerdo a la técnica de Heath y Packer [11] con adición de ácido tiobarbitúrico y butilhidroxitolueno. Las TBARS se determinan espectrofotométricamente.

Mapeo por asociación: Se trabaja con una población de mapeo por asociación de cultivares argentinos desarrollada por INTA Marcos Juárez. Se utilizan mar-





cadores genéticos (bioquímicos y moleculares) y se determinan variables fenotípicas a fin de identificar loci de caracteres cuantitativos (QTLs) vinculados a componentes de rendimiento, adaptación y calidad, por medio de un software adecuado (Tassel versión 3.0.168).

RESULTADOS OBTENIDOS POR EL GRUPO EN LA LÍNEA DE ESTUDIO

Se ha avanzado, junto con numerosos grupos en el mundo, en la caracterización por electroforesis en 1 dimensión, de las subunidades proteicas asociadas a la calidad panadera, se continúa determinando su enorme variabilidad alélica y su potencialidad como método de discriminación entre cultivares de trigo pan [12] y trigo candeal [13]. Se ha comparado esta metodología con otras como electroforesis en 2 dimensiones, espectrometría de masas por tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se ha visto que muestran una buena performance en la identificación [14]. Se ha comprobado también, que tratamientos con nitrógeno (N) y azufre (S) afectan subunidades proteicas relacionadas con calidad [15].

También, el estrés térmico aplicado en cámaras climatizadas a líneas isogénicas de trigo pan, causó una disminución del peso de mil granos y un incremento en el contenido de proteína en grano con diferencias significativas cuando se comparaban todas las líneas. También redujo el contenido total de gliadinas (Fig. 1), y la cantidad de proteína presente en algunas bandas individuales de gluteninas y gliadinas. La fertilización nitrogenada, por su parte, aumentó el porcentaje de proteína, con diferencias significativas entre gluteninas y gliadinas.

Cuando se aplicaron en conjunto estrés térmico y nutricional y se analizó su efecto sobre componentes del rendimiento del vástago principal se encontró que el estrés térmico aplicado 10 días después de anthesis no afectó el número de granos, pero si el peso de mil. Además, las plantas deficientes en N, con o sin S, mostraron mejor comportamiento frente al estrés térmico posterior, con respecto a las plantas bien nutridas. Esto también se evidencia con algunos cultivares en los ensayos a campo, donde se observó que el estrés térmico afectó más las subunidades de gliadinas en los tratamientos con alto N (Fig. 2).

Con respecto a los metabolitos presentes en los exudados floemáticos en el análisis conjunto de las muestras obtenidas en 2008 y 2009 se han detectado casi tres mil masas metabólicas. Se pudo ver que los dos años fueron muy



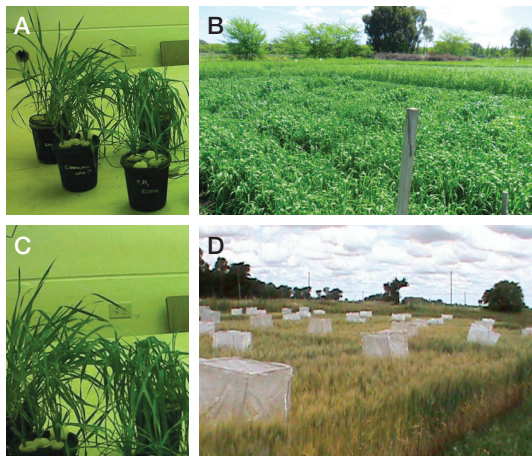


Figura 1. Imagen compuesta de ensayos realizados.

A) Ensayo en cámaras climatizadas para evaluar estrés oxidativo en plántulas.
B) Ensayo a campo estación Azul con la población de mapeo de asociación.
C) Ensayo en cámaras climatizadas para evaluar el efecto del estrés térmico en llenado de granos.
D) Ensayo a campo estación Azul para evaluar el efecto del estrés térmico en llenado de granos.

distintos entre sí, sin superposiciones. Además, cambió la distribución de los cultivares en los dos años [16]. Cuando se evaluó el efecto de la fertilización nitrogenada sobre el perfil de metabolitos de las muestras –a través de la ionización por electrospray y la separación por espectrometría de masas por tiempo de vuelo–, se encontró, aunque con excepciones, que se puede distinguir entre las distintas combinaciones de cultivar y N, con superposición en algunas variedades. Además, las diferencias genotípicas se correspondieron con disímiles distribuciones de los cultivares en el diagrama de componentes principales, lo cual puede corresponderse con diferentes “rutas metabólicas”. Es más, ciertas masas fueron identificadas como altamente influyentes en las disgregaciones. Algunas masas mostraron diferencias entre cultivares pertenecientes a diferentes grupos de calidad panadera, y entre los dos tratamientos de N. Tres masas fueron significativas para la interacción cultivar-tratamiento y mostraron cambios en el ranking de cultivares con respecto al tratamiento de N.

Con respecto a los estudios asociativos, se mapearon por asociación QTLs relacionados con componentes de adaptación, rendimiento y calidad, utilizando un set de genes de función conocida, sobre muestras provenientes de un ensayo a campo llevado a cabo en 2013 (Fig. 2). Los análisis se llevaron a cabo bajo un modelo lineal mixto y se encontraron 11 *loci* con efecto sobre 24 de los



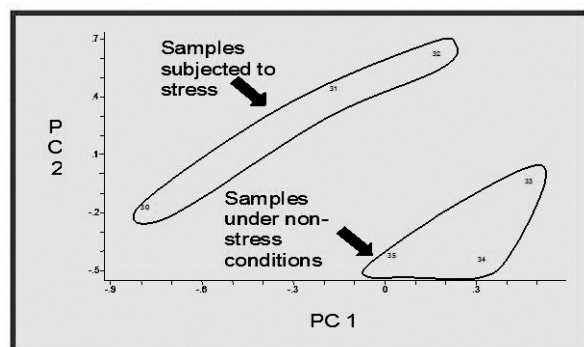


Figura 2. Gráfico de componentes principales para la cantidad relativa de las gliadinas individuales de la línea isogénica 54. Los 3 puntos en cada grupo son réplicas de plantas de experimentos realizados en cámaras climatizadas.

35 caracteres medidos de los cuales al menos 5 *loci* podrían tener efecto directo sobre las variables fenotípicas evaluadas.

Con respecto al daño oxidativo, en 2011, 2012 y 2013 se han desarrollado ensayos donde se aplicó estrés térmico a plántulas de trigo candeal (Fig. 3). Se aplicó la técnica del ácido tiobarbitúrico en muestras de hojas de plántulas de dos líneas puras (“Cumenay” y “Chagual”) y de dos familias de la tercera generación filial, procedentes del cruzamiento de dichas líneas puras.

Se encontró que las plantas F_3P_{12} derivadas de la familia perteneciente a la tercera generación filial, resultaron afectadas por el estrés térmico, aunque hubo diferencias en su comportamiento entre los años (Fig. 1).

POTENCIALIDADES DE LA LÍNEA DE ESTUDIO

Se continuará con la caracterización de las combinaciones de subunidades proteicas vinculadas con calidad, incorporando al análisis su comportamiento frente a estrés térmico. Se pretende identificar las variantes alélicas por PCR y por electroforesis en 2 dimensiones. Se avanzará en la cuantificación del % de UPP, gliadinas y gluteninas por RP-HPLC (Facultad de Ingeniería Química de la UNICEN).



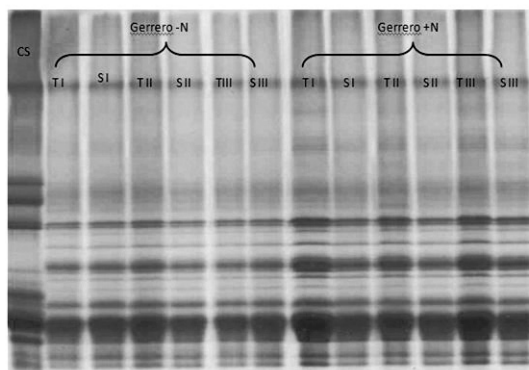


Figura 3. Sección gel de gliadinas ensayo campo 2008. CS = Marcador Chinese Spring T = testigo S = estrés.

Con respecto a los análisis metabolómicos de las muestras de exudados, se está avanzando en la identificación de las masas, dentro de un set de metabolitos candidatos. Y se pretende realizar este tipo de estudios sobre las muestras de granos obtenidas de los ensayos a campo y en cámaras.

En lo que se refiere a la determinación del daño oxidativo y debido a la heterogeneidad de los datos obtenidos en los ensayos durante 2011, 2012 y 2013, se pretende sumar a los análisis, cultivares de trigo pan (*Triticum aestivum*).

OFERTA TECNOLÓGICA

Estudios asociativos de componentes de rendimiento, adaptación y calidad en trigo.

Determinación de las variantes alélicas de gluteninas y gliadinas por geles de poliacrilamida en una dimensión.

Determinación del perfil metabolómico presente en muestras de exudados floemáticos por medio de ESI-MALDI-TOF en la Universidad de Sheffield, Inglaterra.

Determinación del daño oxidativo por TBARs.





REFERENCIAS

1. Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). Disponible en <http://www.fao.org> Último acceso Septiembre 26, 2014.
2. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de Argentina. Disponible en <http://www.minagri.gob.ar> Último acceso Septiembre 26, 2014.
3. Naeem H-A, MacRitchie F (2005) Polymerization of glutenin during grain development in near-isogenic wheat lines differing at *Glu-D1* and *Glu-B1* in greenhouse and field. *J Cereal Sci* 41(1):7-12.
4. National Aeronautics and Space Administration. Disponible en <http://climate.nasa.gov/effects/> Último acceso Septiembre 26, 2014.
5. IPCC (2013) Summary for Policymakers. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, eds. Stocker TF *et al.*, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
6. Savin R (2010) Estrés térmico y calidad en cereales de invierno. *Avances en ecofisiología de cultivos de granos*, eds Miralles DJ, Aguirrezábal LN, Otegui ME, Kruk BC, Izquierdo N (Facultad de Agronomía) pp 203-210.
7. Don C, Lookhart G, Naeem H, MacRitchie F, Hamera, R-J (2005) Heat stress and genotype affect the glutenin particles of the glutenin macropolymer-gel fraction. *J Cereal Sci* 42(1):69-80.
8. Gill S-S, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch* 48(12):909-930.
9. Gupta R-B, MacRitchie F (1991) A rapid one-step one-dimensional SDS-PAGE procedure for analysis of subunit composition of glutenin wheat. *J Cereal Sci* 14(2):105-109.
10. Caputo C, Barneix A-J (1999) The relationship between sugar and amino acid export to the phloem in young wheat plants. *Ann Botany* 84(1):33-38.
11. Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. II. Role of electron transfer. *Arch Biochem Biophys* 125(3):850-857.
12. Lerner S-E, Kolman M-A, Rogers W-J (2009) Quality and endosperm storage protein variation in Argentinean grown bread wheat. I. Allelic diversity and discrimination between cultivars. *J Cereal Sci* 49(3):337-345.
13. Lerner *et al.* (2004) Genetic variation for grain protein components and industrial quality of durum wheat cultivars sown in Argentina. *J Cereal Sci*. 40(2):161-166.





14. Liu *et al.* (2010) Comparison of low molecular weight glutenin subunits identified by SDS-PAGE, 2DE, MALDI-TOF-MS and PCR in common wheat. *BMC Plant Biol* 10(junio 2010):124.
15. Rogers *et al.* (2006) Effects of nitrogen and sulfur fertilizers on gliadin composition of several cultivars of durum wheat. *Cereal Chem* 83(6):677-683.
16. Basile *et al.* (2012) Perfil metabólico de los exudados floemáticos de cultivares argentinos de trigo pan cultivados bajo diferentes suministros de nitrógeno. *Cereales de Invierno. Investigación Científico-Técnica*, eds. Stenglein SA, Moreno MV, Cogliatti M, Rogers W J, Carmona MA, Lavado RS (UNCPBA) pp 138-146.





CAPÍTULO 7

Mecanismos de respuesta a estreses ambientales: en busca del aumento de la productividad de cultivos de interés agronómico

Giselle Martínez-Noël, Leandra Lechner,
María Victoria Martín, Néstor Aznar, Graciela L. Salerno

Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (INBIOTEC-CONICET), y Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
gnoel@fiba.org.ar

RESUMEN

En su ambiente natural, las plantas están expuestas frecuentemente a condiciones ambientales desfavorables para su crecimiento y desarrollo, causadas por diferentes factores climáticos (temperaturas extremas, sequía, inundación, aumento de la salinidad de los suelos). Dichos factores constituyen la principal causa de la disminución de la productividad de los cultivos de interés agronómico. Por otra parte, hay una necesidad actual de incrementar las áreas cultivables, desplazándose a zonas menos favorables y por lo tanto, menos productivas.

Desde hace más de dos décadas, nuestro grupo de investigación se ha enfocado en el estudio de las complejas respuestas de las plantas a diferentes estreses ambientales, con el objetivo de identificar puntos regulatorios que permitan generar herramientas para la obtención de cultivos que resulten más tolerantes a sequía, temperaturas extremas y salinidad. En la actualidad las líneas de inves-





tigación están enfocadas hacia el estudio de la interrelación entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno y su vinculación con los distintos fenómenos ambientales adversos, haciendo énfasis en la comprensión de los caminos de señalización que involucran azúcares y reguladores de crecimiento. La identificación de los genes involucrados en dichas vías de transducción de señales que afecten la tolerancia de la planta frente a los estreses abióticos va a permitir diseñar estrategias para ser usadas en el mejoramiento de cultivos de interés.

INTRODUCCIÓN

En los próximos años se necesitará incrementar la producción agrícola teniendo en cuenta el aumento poblacional y la generación de biocombustibles [1]. Una de las limitaciones más importantes en la agricultura moderna es la disminución sostenida de la disponibilidad de áreas cultivables debido a condiciones ambientales desfavorables provocadas principalmente por el cambio climático y la práctica de cultivos intensivos [1, 2].

A diferencia de los animales, las plantas son organismos sin capacidad locomotora por lo que no pueden escapar a las condiciones ambientales adversas. Es así, que a lo largo de su evolución han desarrollado complejas respuestas de adaptación y supervivencia, que les permiten sobrellevar las situaciones de estrés. Sin embargo, frecuentemente las condiciones externas desfavorables se reflejan en una disminución en su tasa de crecimiento y desarrollo y una menor productividad. Se ha reportado que los estreses abióticos (principalmente temperaturas extremas, salinidad y sequía) provocan más del 50% de la pérdida de rendimiento global en la agricultura [3].

Las plantas perciben las señales del medio ambiente y las transmiten a sus células activando procesos complejos conocidos como vías de señalización, que implican la activación o inactivación de genes específicos. Dichos genes desencadenan mecanismos que protegen y/o reparan los daños ocasionados por el estrés permitiendo que la planta sobreviva (Figura 1). La comprensión de estas respuestas adaptativas es fundamental para poder abordar y desarrollar nuevas estrategias para la obtención de cultivos de interés agronómico más tolerantes a estreses ambientales. La disponibilidad de dichos cultivos permitirá, entonces, en el futuro, desplazar la agricultura hacia otras regiones, hoy consideradas marginales o poco productivas, y aprovechar suelos más inhóspitos, con la posibilidad de tener rendimientos aceptables. En nuestro país, el



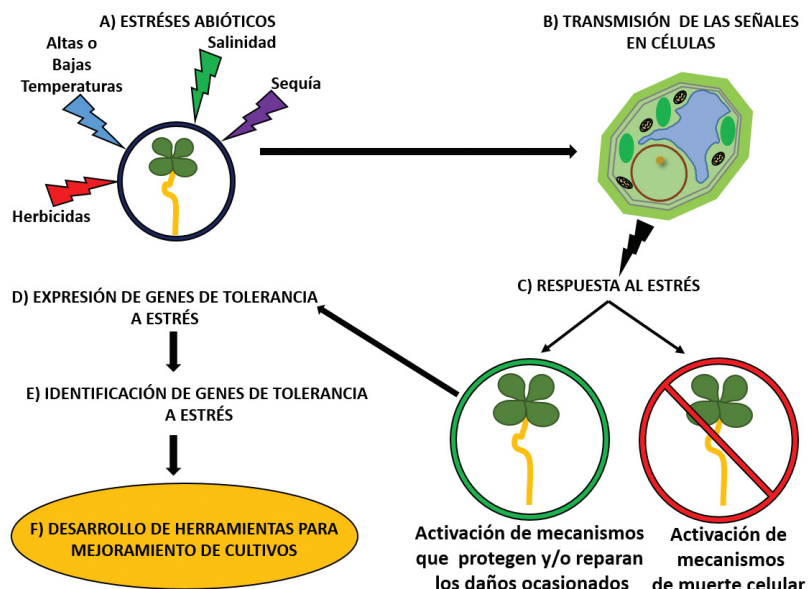


Figura 1. Esquema que ilustra los pasos para generar nuevas herramientas para la obtención de cultivos con tolerancia a un estrés abiótico.

mejoramiento de cultivos a nivel genético y la producción de semillas están comprendidos en uno de los Núcleos Socio-Productivos del Plan Estratégico Argentina Innovadora 2020 del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (dado a conocer en el año 2012).

Con esta meta, nuestro grupo de investigación ha enfocado sus estudios en cultivos diferentes de trigo (*Triticum* spp.) y en una planta modelo (*Arabidopsis thaliana*), que permite la generación de mutantes en genes considerados de importancia en las respuestas a estreses abióticos. Se han puesto a punto técnicas para realizar una exploración rápida de los fenotipos de las distintas mutantes (nulas en uno o más genes de interés) y de distintos cultivares de trigo sometidos a diferentes condiciones de estrés.





El trigo provee aproximadamente un quinto del total de la ingesta calórica de la población mundial [4], y su cultivo es de gran relevancia para la Argentina, con un área sembrada de 3 millones de hectáreas y una producción de alrededor de 8 millones de toneladas según datos de la campaña 2012/1013 [5]. Sin embargo, aunque el trigo sigue siendo el cereal con mayor área cultivada del país, la tierra destinada a este cereal ha ido disminuyendo en los últimos años, siendo un factor determinante las condiciones climáticas adversas [5].

En Argentina, se estima que las pérdidas ocasionadas por factores abióticos ambientales (que incluyen, entre otros, sequía, salinidad, inundación, bajas y altas temperaturas) en el cultivo del trigo conducen a una gran disminución del rendimiento máximo anual [6]. Es por esto que el estudio de mecanismos genéticos que influyeran positivamente la productividad de diferentes cultivos de trigo, en un amplio rango de entornos ambientales, podría aportar directamente a una agricultura mejor adaptada a las condiciones agroclimáticas de diferentes regiones.

En este capítulo, se presentan los avances en las investigaciones, las herramientas desarrolladas y las potencialidades de las líneas de estudio de nuestro grupo de investigación.

RESULTADOS OBTENIDOS POR EL GRUPO

Desde hace más de dos décadas, nuestro grupo de investigación se ha centrado en el estudio a nivel fisiológico y bioquímico-molecular del metabolismo de los hidratos de carbono y su rol en la respuesta a condiciones ambientales adversas. Uno de los objetivos planteados en una primera etapa ha sido incrementar el contenido de almidón en los granos de cereales y/o el aumento del número de granos por planta a través del aumento de la síntesis de la sacarosa. Este azúcar es el principal producto de la fotosíntesis que es transportado a los tejidos que demandan carbono y energía. Se ha demostrado que la sacarosa, y polímeros de fructosa derivados de ella, tienen también una función importante en la tolerancia a bajas temperaturas, sequía y salinidad [7].

Como resultados relevantes de nuestro grupo, se destacan la generación de plantas de tabaco (otro modelo experimental usado) y de arroz en las que se incrementó la producción de sacarosa por ingeniería genética y que resultaron tolerantes a sequía en ensayos de invernáculo. Los estudios más recientes se han enfocado hacia la importancia de los azúcares, como moléculas señal que regulan





el metabolismo, desarrollo y crecimiento de las plantas y en su rol en la respuesta a estreses. Actualmente se llevan a cabo proyectos cuyos objetivos específicos son: i) el estudio de la interrelación del metabolismo del carbono y del nitrógeno y su vinculación con fenómenos ambientales adversos; y ii) la dilucidación de caminos de señalización que involucran azúcares y reguladores claves del crecimiento y desarrollo. Nuestro grupo ha demostrado el rol fundamental de las invertasas alcalino/neutras (enzimas que hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa) en la morfogénesis de la raíz, en la biosíntesis del aparato fotosintético, en la acumulación del almidón cloroplástico y en la adaptación a estreses abióticos [8]. Además, la relevancia de ciertas isoformas de invertasas en la tolerancia al estrés salino, fue puesta en evidencia cuando plantas mutantes de *Arabidopsis* incapaces de sintetizar estas proteínas, presentaron una notable disminución en el largo radicular en comparación con las plantas provenientes de semillas salvajes (Figura 2). Por otro lado, se ha demostrado que aumenta la expresión de algunas invertasas específicas en respuesta a estreses ambientales en hojas de trigo luego de ser sometidas a bajas temperaturas o a un estrés osmótico [8].

Por otra parte, hemos caracterizado en trigo moléculas claves involucradas en la regulación de la síntesis de fructanos, polímeros de fructosa que se acumulan en respuesta a bajas temperaturas [9].

HERRAMIENTAS UTILIZADAS EN EL DESARROLLO DE LAS INVESTIGACIONES

Para estudiar los mecanismos de percepción y señalización del estrés como una herramienta para aumentar la tolerancia de los cultivos frente a factores ambientales adversos, nos focalizamos en la identificación de genes reguladores claves en el control del reajuste metabólico ante condiciones desfavorables en una planta de interés agronómico (como el trigo) y en la planta modelo *Arabidopsis*.

Si bien el trigo es uno de los cultivos más importante en el mundo, la falta de disponibilidad de la secuencia completa de su genoma a nivel público constituye, en el presente, un impedimento para el avance en las investigaciones. El trigo es una especie hexaploide con un genoma de 17 gigabases, es decir, aproximadamente 125 veces más grande que el de *Arabidopsis*. A pesar de su complejidad genómica, se dispone de una gran variedad de bases de datos con una amplia gama de herramientas bioinformáticas. Por ejemplo, hasta



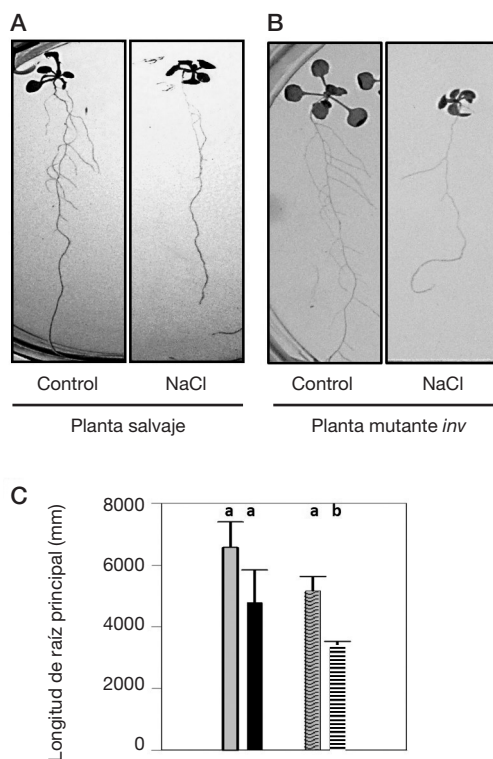


Figura 2. Fenotipo de plantas salvajes y mutantes en el gen que codifica una invertasa de *Arabidopsis thaliana* bajo estrés salino.

Plantas salvajes y mutantes de *Arabidopsis* fueron cultivadas en condiciones de crecimiento control por 7 días (T: 22 °C, 125 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica y fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad) y luego fueron transferidas a condiciones de estrés (100 mM de NaCl) por otros 7 días.

La mutante, en el gen que codifica una invertasa (*inv*), no presenta diferencias fenotípicas con respecto a las plantas salvajes en condición control. Por otro lado, las plantas mutantes sujetas a estrés salino redujeron la longitud de la raíz principal (B), respecto de las plantas salvajes (A), demostrando la importancia de la expresión de este gen en respuesta al estrés salino. C) Cuantificación de la longitud de la raíz principal en plantas salvajes (barra gris) y mutantes de *inv* (barra gris con rayas) crecidas bajo condiciones control y de plantas salvajes (barra negra) y mutantes *inv* bajo tratamiento de estrés salino (barras negras con rayas). Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencias estadísticas ($P = < 0.001$).





el momento se conoce la secuencia de aproximadamente 40.000 genes que se transcriben (EST, www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html). Además, se encuentra disponible la secuencia genómica completa del arroz, que junto al trigo y al maíz constituyen los cereales más importantes para la alimentación mundial, y a partir de esta información se pueden obtener secuencias de genes homólogos en trigo [10].

Arabidopsis es una herramienta que posee grandes ventajas para el estudio en genética y biología molecular de plantas, a pesar de que no posee interés agronómico. Es una planta de fácil cultivo y manipulación en condiciones de laboratorio, posee un ciclo de vida corto, tiene un gran número de descendencia, su genoma ha sido secuenciado y hay disponibles un gran número de líneas mutantes a las que puede accederse fácilmente. También es importante destacar que se cuenta con bases de datos y herramientas bioinformáticas de acceso libre referentes a esta planta modelo [11].

El sistema experimental puesto a punto en nuestro grupo de trabajo se resume en la Figura 3. Brevemente, realizamos análisis bioinformáticos exhaustivos en las bases de datos disponibles de experimentos de expresión génica a gran escala de Arabidopsis, trigo o arroz con el objetivo de identificar genes candidatos potencialmente involucrados en respuestas a los diferentes estreses abióticos. En segundo lugar, se obtienen las mutantes en el/los gen/es de interés de la base de germoplasma “The Arabidopsis Biological Resource Center (TAIR)” (Fig. 3 A).

Las semillas de plantas mutantes y salvajes (utilizadas como control) de Arabidopsis o de distintos cultivares de trigo son germinadas en medio nutritivo estéril o en suelo, respectivamente. Las plántulas de 6-7 días, son expuestas frente a distintos tratamientos o condiciones de estrés (salinidad, sequía, estrés oxidativo producido por herbicidas y temperaturas extremas) y posteriormente se analizan las características fenotípicas (Fig. 3 B-D). A partir de estos resultados se identifican los genes candidatos que podrían conferir tolerancia a un estrés en particular. Estos genes luego son caracterizados mediante técnicas de biología molecular, bioquímica y bioinformática. Se realizan estudios de la expresión génica (RT-PCR y/o qPCR) y se analizan los tejidos de plantas que expresan genes reporteros (GUS o GFP) bajo el control del promotor del gen de interés, por técnicas histoquímicas (Fig. 3 E y F). Por otro lado, la caracterización funcional de los genes de interés se lleva a cabo por estudios bioquímicos de las proteínas recombinantes expresadas en un sistema heterólogo.



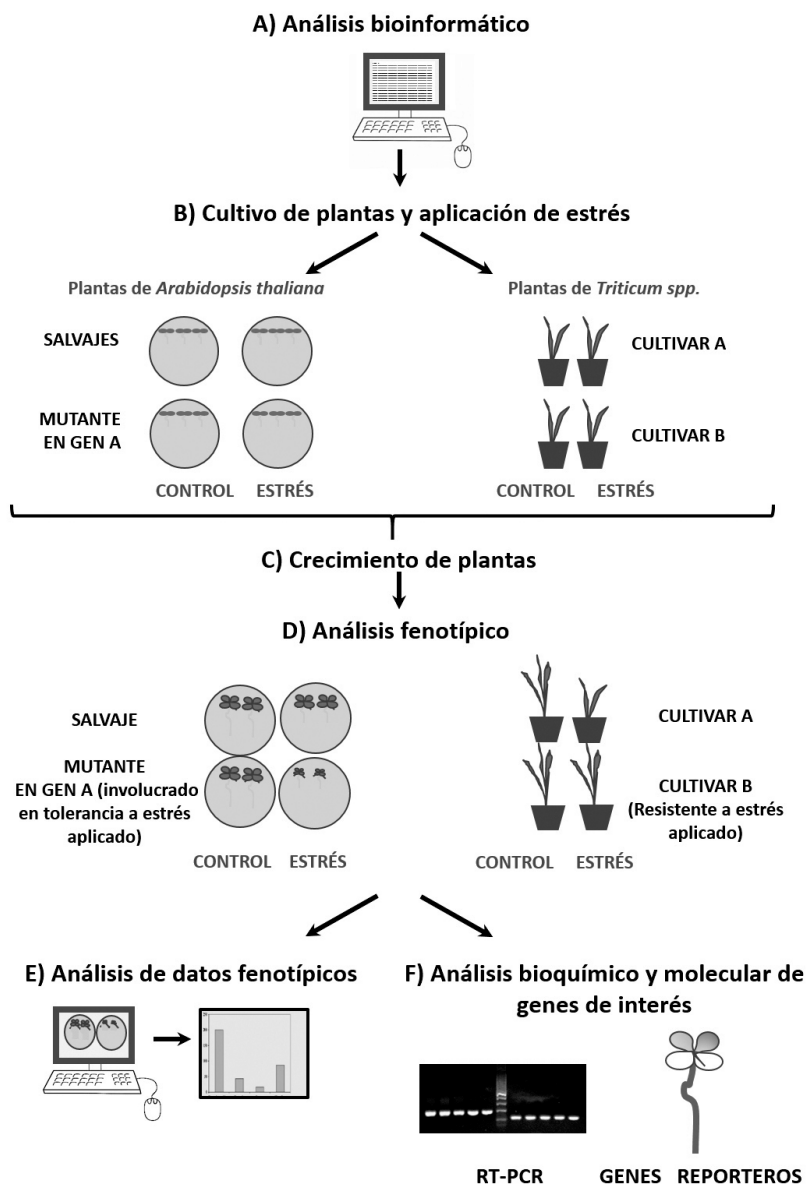


Figura 3. Esquema que ilustra el sistema experimental utilizado.





PERSPECTIVAS FUTURAS

El aumento de la productividad agrícola es la principal meta de la agricultura, y teniendo en cuenta el incremento en la demanda por el aumento de la población mundial, la disminución de las áreas cultivables, y las condiciones desfavorables asociadas al cambio climático global, esto sólo podrá lograrse a partir de la obtención de cultivos tolerantes, en particular, a estreses abióticos. La estrategia más prometedora y que puede llevar a logros en tiempos más cortos, es la que ofrece la ingeniería genética.

El estudio y conocimiento de los mecanismos de percepción y señalamiento de las respuestas a estreses abióticos son esenciales e indispensables para lograr este objetivo. Consideramos que identificar genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo y regulación de azúcares, por ejemplo las invertasas, son blancos claves para aumentar la tolerancia y productividad de cultivos de interés agronómico.





REFERENCIAS

1. FAO. Agricultura en el mundo 2015/2030 (2002) <http://apps.fao.org/>.
2. Ronald PC (2014) Lab to Farm: Applying Research on Plant Genetics and Genomics to Crop Improvement. *PLoS Biol* 12(6):e1001878.
3. Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K (2011) Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol* 11(163):1471-2229.
4. Reynolds M, Foulkes MJ, Slafer GA, Berry P, Parry MAJ, Snape JW, William JA (2009) Raising yield potential in wheat. *J Exp Bot* 60(7):1899-1918.
5. Barberis, N (2014) Evolución y perspectiva mundial y nacional de la producción y el comercio de trigo. *Cartilla Digital Manfredi* 2014/4.
6. RET- Red de ensayos comparativos de variedades de trigo. Instituto Nacional de Semillas (INASE). (inase.gov.ar).
7. Puebla AF, Salerno GL, Pontis HG (1997) Fructan metabolism in two species of *Bromus* subjected to chilling and water stress. *New Phytol* 136(1):123-129.
8. Vargas WA, Martin ML, Salerno GL (2013) Myths and Facts on Cytosolic Sucrose Hydrolysis. *Properties, Biosynthesis and Health Implications*, ed Salvatore Magazù.
9. (NOVA Science Publishers INC., Hauppauge, NY, USA), pp 155-176.
10. Tognetti J, Pontis H, Martínez-Noël G (2013) Sucrose signaling in plants: A world yet to be explored. *Plant Signal & Behav* 8(3):e23316.
11. International Wheat Genome Sequencing Consortium (2014) A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science* 345(6194):1251788.
12. The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(6814):796-815.





CAPÍTULO 8

Estudios de poblaciones de hongos fitopatogenos y su interaccion con plantas de importancia agronómica

V. Fabiana Consolo, Laura E. Giarrocco, Graciela L. Salerno

Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (INBIOTEC-CONICET), y Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
faconsolo@fiba.org.ar

RESUMEN

Los hongos fitopatógenos producen cuantiosas pérdidas en la producción agrícola de nuestro país. El estudio de las poblaciones nativas de hongos fitopatógenos y de su interacción con las variedades en cultivo constituye una herramienta fundamental para el diseño de estrategias de manejo y mejoramiento de plantas de importancia agronómica.

La presente línea de investigación tiene como objetivo general la aplicación de nuevas tecnologías para estudiar patosistemas de interés en la producción agrícola de nuestro país con el fin de transferir la información generada al desarrollo de variedades con resistencia duradera a patógenos, tarea que requiere de un enfoque integrado del mejoramiento tradicional y las nuevas tecnologías.

La disponibilidad pública de los genomas de arroz y de *Magnaporthe oryzae*, su principal patógeno fúngico, ha llevado a que este patosistema sea estudiado como modelo para el estudio de la interacción planta-patógeno en monocotiledóneas. Dada la importancia económica del arroz a nivel regional y mundial, y los escasos antecedentes en nuestro país acerca de estudios intensivos de este





patosistema, nuestro grupo de trabajo abordó la problemática mediante un enfoque integrado, realizando la caracterización molecular del germoplasma de arroz de Argentina así como de la población nativa de *M. oryzae* y de su interacción. Estos estudios fueron desarrollados mediante la aplicación de modernas técnicas moleculares que se integran a las técnicas clásicas para la obtención de resistencia durable a la enfermedad producida por el hongo.

La estrategia de estudio utilizada y las técnicas desarrolladas son aplicables a otros patosistemas de interés agronómico. La capacidad instalada, tanto de recursos humanos formados como de metodologías, forma parte de la oferta tecnológica de nuestro grupo de trabajo.

INTRODUCCIÓN

El aumento de la población mundial, la disminución de la superficie de tierras cultivables, la escasez de agua, la evolución de nuevos biotipos de plagas, la aparición de nuevas enfermedades y el cambio climático plantean serios desafíos a los mejoradores de cultivos para aumentar su producción y la productividad por planta [1].

Particularmente, los hongos fitopatógenos producen cuantiosas pérdidas en la producción agrícola de nuestro país. El estudio de las poblaciones nativas de hongos fitopatógenos y de su interacción con las variedades en cultivo constituye una herramienta fundamental para el diseño de estrategias de manejo y mejoramiento de plantas de importancia agronómica.

La presente línea de investigación tiene como objetivo general la aplicación de nuevas tecnologías para estudiar patosistemas de interés para la producción agrícola de nuestro país. La transferencia de la información generada al desarrollo de variedades con resistencia duradera a patógenos requiere de un enfoque integrado del mejoramiento tradicional y las nuevas tecnologías. Por lo tanto, este nuevo enfoque permitirá realizar un abordaje diferente que promoverá la investigación interdisciplinaria y actuará como nexo entre fitopatólogos, genetistas, fitomejoradores e ingenieros agrónomos para el desarrollo de estrategias de mejoramiento adecuadas en el manejo de enfermedades de los cultivos.

La disponibilidad pública de los genomas totalmente secuenciados de arroz y de *Magnaporthe oryzae*, su principal patógeno fúngico, ha convertido a este patosistema en un modelo para el estudio de la interacción planta-patógeno en monocotiledóneas [2]. Dada la importancia económica del arroz a nivel mundial y regional y los escasos antecedentes en nuestro país acerca de estu-





dios intensivos de este patosistema, nuestro grupo de trabajo comenzó con el estudio de esta problemática hace más de una década, enfocándose en la caracterización molecular del germoplasma de arroz de Argentina así como de la población nativa de *M. oryzae* y de su interacción.

El arroz (*Oryza sativa* L.) es el alimento básico de más de la mitad de la humanidad y su siembra comprende aproximadamente el 11% de la superficie cultivable de la tierra. La región arrocería en Argentina está ubicada en el noreste del país, siendo la producción de arroz uno de los componentes principales de la economía de las provincias que la integran. Las enfermedades son uno de los factores más importantes que limitan la producción de arroz.

El “tizón del arroz” o piriculariosis causada por el hongo *Pyricularia oryzae* (Po) Cavara, el anamorfo de *M. oryzae* B. C. Couch [3], es la principal enfermedad fúngica y una de las más devastadoras del cultivo de arroz a nivel mundial y en nuestro país. *M. oryzae* es un hongo considerado como modelo de la biología y evolución poblacional de patógenos fúngicos y de la genética molecular que gobierna la patogénesis de las interacciones biotróficas-hemibiotróficas con plantas hospedantes (2). Este patógeno ataca la planta en todos los estadios de su desarrollo y en todos los ecosistemas (Fig. 1), ocasionando cuantiosas pérdidas en la cosecha del grano, estimadas anualmente en alrededor de 160 millones de toneladas, cantidad suficiente para alimentar 60 millones de personas [4]. Po posee un amplio rango de hospedantes dentro de la familia Gramineae y recientemente se ha descrito la presencia de la enfermedad causada por este patógeno en cultivos de trigo ocasionando daños y pérdidas económicas de consideración en países limítrofes de la Argentina. Desde el año 2012 la presencia de este hongo ha sido descrita en cultivares de trigo de Argentina, lo cual representa una verdadera amenaza para nuestro país.

El uso de cultivares de arroz resistentes al patógeno y de fungicidas son el modo más común de control de la enfermedad. Sin embargo, la vida útil de muchos cultivares resistentes es de pocos años, debido a la alta tasa de mutación en el genoma del hongo que le permite generar una población con gran variabilidad patogénica que puede eludir el sistema de defensa de la planta y producir el quiebre de la resistencia de los cultivares [5]. Por otra parte, el uso de pesticidas además de ser costoso es nocivo para el medio ambiente.

El conocimiento de los mecanismos moleculares de la resistencia a patógenos es esencial para el diseño de estrategias más adecuadas para el control de las enfermedades que afectan al cultivo de arroz.



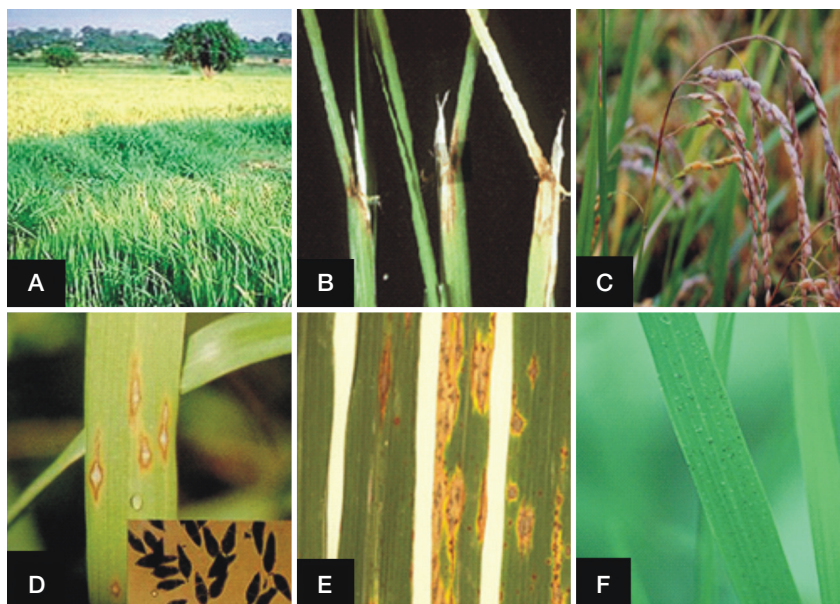


Figura 1. Sintomatología de la piriculariosis del arroz, enfermedad causada por *P. oryzae*.

A) cultivo atacado por *Po*, B) lesiones de cuello, C) lesiones de panoja, D) detalle de lesión en hoja con forma de huso y detalle de esporas triseptadas de *Po*, E) distintos grados de lesiones en hoja, F) detalle de hoja de arroz presentando una reacción incompatible en la interacción con *Po*.

Los hongos patógenos de plantas producen una batería de moléculas efectoras para subvertir la defensa del huésped. Entre ellas se incluyen algunas con actividad de avirulencia (codificadas por genes de avirulencia, *Avr*) que son reconocidas específicamente por proteínas de la planta codificadas por genes de resistencia (*R*). Este reconocimiento resulta en una respuesta de defensa conocida como inmunidad específica o mediada por efectores que es una respuesta rápida y fuerte que impide el avance del patógeno. Dicha inmunidad es una manifestación de la resistencia “gen por gen”, en la cual para cada gen dominante *R* en la planta hay una correspondencia (reconocimiento específico) con





un gen dominante *Avr*. En este tipo de interacción incompatible, la cual no resulta en enfermedad, la raza específica del patógeno es llamada avirulenta y el cultivar de la planta, resistente. En contraste, en una interacción compatible que ocurre en ausencia del reconocimiento “gen por gen” y resulta en enfermedad, el patógeno es llamado virulento y la planta susceptible.

El análisis de los genes que se expresan diferencialmente en la respuesta incompatible y compatible durante la interacción arroz-*Po* representa una herramienta poderosa para obtener una visión de los eventos moleculares que subyacen a la respuesta de la planta al patógeno.

Para desarrollar estrategias que provean nuevos cultivares de arroz con resistencia duradera y de amplio espectro a *Po* se debe contar previamente con la identificación de combinaciones adecuadas de genes *R* basada en el conocimiento de la estructura genética y la diversidad y frecuencia de los genes *Avr* en la población nativa del patógeno y con la caracterización molecular del germoplasma de arroz adaptado a la zona de cultivo. La aplicación de la información generada facilita la posterior incorporación de los genes *R* adecuados en los cultivares elite para el desarrollo de variedades con resistencia duradera al patógeno.

El control de la piriculariosis en arroz mediante la introducción de genes de resistencia a *Po* (*RPo*) en cultivares de interés por mejoramiento genético tradicional ha tenido un éxito limitado, ya que se ha producido el quiebre de la resistencia a razas específicas de *Po* bajo condiciones de campo [7]. La principal causa de pérdida de resistencia de los cultivares de arroz es el surgimiento de nuevas razas o patotipos del hongo que resultan virulentos a cultivares previamente resistentes. Se ha demostrado que la emergencia de nuevas razas virulentas del patógeno resulta de la modificación genética de los genes *Avr* por diversos mecanismos [8]. Un análisis más detallado de los genes *Avr* presentes en aislamientos nativos del patógeno puede proporcionar información valiosa en relación a la efectividad de los genes *R* presentes en los cultivares utilizados en la producción a campo.

Para un adecuado control de la piriculariosis, es necesario que los distintos programas de mejoramiento de arroz seleccionen los genes/genotipos de utilidad en base a su incompatibilidad con los genotipos/variantes de virulencia o razas fisiológicas nativas del hongo que son detectadas durante el proceso de mejoramiento. La estrategia llamada “exclusión de linajes” [9] consiste en la combinación de genes *RPo* que sean efectivos contra todos los linajes exis-





tentes en la zona en la que se cultivarán las variedades mejoradas. Entonces, la caracterización de las poblaciones nativas del patógeno es un paso ineludible para identificar cual es la estructura genética y patogénica subyacente e identificar los genes *RPo*, que otorgarían protección frente a dichas variantes patogénicas. Con esa información disponible, los alelos de resistencia pueden ser introducidos en los cultivares elite confiriendo una resistencia de mayor espectro y, consecuentemente, obteniendo una resistencia más durable. De esta forma la identificación de genes de resistencia y su incorporación en variedades susceptibles contribuye a una producción más sostenible del cultivo [10].

A lo largo de los años, los métodos para la detección y el análisis de la diversidad genética del patógeno y del germoplasma de arroz han evolucionado desde el uso de características morfológicas o fenotípicas, al uso de isoenzimas, hasta la aplicación de marcadores de DNA. El término marcador molecular (MM) hace referencia a cualquier *locus* del genoma, no necesariamente correspondiente a un gen, cuyas variantes alélicas (polimorfismos en el DNA) son fácilmente identificables mediante técnicas moleculares. Además, un *locus* marcador sirve para identificar o ‘marcar’ la región cromosómica en la que se encuentra, y en mejoramiento genético, permite que la región ligada a él pueda ser estudiada a lo largo de las generaciones. El advenimiento de las técnicas de MM ha permitido desarrollar nuevas metodologías para caracterizar la estructura y dinámica poblacional de *Po* en forma más precisa y reproducible. Además, los MM ofrecen una medida fácilmente cuantificable de la variación genética del germoplasma.

Durante el proceso de mejora genética es a menudo difícil monitorear la presencia de genes *RPo* individuales en las líneas en desarrollo debido a que el análisis basado en el fenotipo es afectado por la etapa de desarrollo y las condiciones ambientales, y es enmascarado por la presencia de otros genes *R*. En contraste, MM fuertemente ligados a genes *RPo* y marcadores funcionales (que detectan el polimorfismo funcional en el gen de interés), ofrecen una manera eficiente y rápida de seleccionar varias fuentes de resistencia a la piriculariosis sin necesidad de realizar selección basada en el fenotipo [8]. La introgresión de genes *R* en cultivares elite por mejoramiento tradicional puede tomar entre 15–20 años, pero este proceso puede ser acelerado considerablemente mediante el uso de MM. Se estima que los programas de mejoramiento que utilizan selección asistida por MM reducen en un 50–70% el tiempo para liberar nuevas variedades [9].





Nuestra línea de trabajo ofrece asistir a los programas de mejoramiento tradicionales de cultivos mediante el uso de las nuevas tecnologías que han revolucionado en los últimos años al mejoramiento genético vegetal y que dieron origen a lo que se denomina mejoramiento molecular, que es la conjunción entre la tecnología génica, marcadores moleculares, genómica y bioinformática, para el desarrollo de nuevos y promisorios cultivares.

HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS

Los microsatélites, también conocidos como SSRs (Repeticiones de Secuencias Simples), han sido en las últimas décadas los MM de elección para el análisis de variabilidad genética en distintos organismos dado que son técnicamente simples, económicos, altamente reproducibles y automatizables. Estos MM se basan en la amplificación específica por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de repeticiones en tándem de una secuencia corta y su polimorfismo se debe a la variabilidad en el número de repeticiones de dicha secuencia. Para caracterizar la variabilidad y estructura genética del germoplasma de arroz se utilizaron marcadores SSRs que son marcadores neutros y detectan la variación genética a lo largo de todo el genoma. Para detectar variación genética en regiones funcionales del genoma relacionadas con la resistencia a patógenos en general y a *Po* en particular se utilizaron marcadores funcionales como RGAs, SNPs y otros que detectan los polimorfismos presentes en *loci RPo*.

Los aislamientos del hongo *Po* fueron obtenidos mediante la recolección de muestras de arroz con síntomas de la enfermedad, realizando metodologías clásicas de aislamiento. La identificación y caracterización de los aislamientos se realizó a través de la técnica de *Rep*-PCR, para lo cual se utilizaron cebadores específicos para la especie.

La interacción arroz-*Po* fue estudiada utilizando un método de sustracción de transcritos, con la técnica de hibridación sustractiva [14] basada en PCR, que favorece la amplificación de DNAs de expresión diferencial a partir de los RNAs extraídos de la interacción arroz-*Po* en el sistema de estudio seleccionado.

Para todos y cada uno de los aspectos estudiados se utilizaron herramientas bioinformáticas para integrar la información genómica disponible y para el procesamiento y análisis de datos.





RESULTADOS OBTENIDOS POR EL GRUPO EN LA LINEA DE TRABAJO

La caracterización molecular del patosistema arroz-*Po* en Argentina ha sido uno de los proyectos de nuestro laboratorio desde fines de la década de los '90, y se han publicado a nivel internacional los primeros trabajos exhaustivos sobre la caracterización de poblaciones de *Po* en Argentina, [10, 11]. Utilizando la metodología *Pot* 2-PCR se determinó la diversidad genética encontrada en la población nativa del patógeno de la zona arroceras de Argentina en las campañas 2000-2005. Se obtuvieron 161 aislamientos nativos y se determinó su espectro de virulencia, así como los mecanismos que pueden generar variabilidad en dichas poblaciones. Se encontraron 42 haplotipos diferentes que se pudieron clasificar en 7 grupos y fueron representativos de las 8 razas fisiológicas establecidas a nivel mundial. La evaluación de compatibilidad de los aislamientos representativos de los linajes más importantes y las diferentes fuentes de resistencia y sus combinaciones permitió determinar que la combinación de los genes *Pi* 1, *Pi* 2 y *Pi* 33 otorga una resistencia completa a todos los aislamientos nativos analizados [10].

Por otra parte, se evaluó a nivel de DNA la diversidad genética de cultivares de arroz de importancia histórica para el cultivo y la producción de arroz en Argentina. Fueron analizadas setenta accesiones con 26 MM del tipo SSRs que revelaron las relaciones genómicas entre los cultivares. Se detectaron un total de 217 bandas polimórficas, generando una base de datos útil para la identificación varietal, la conservación del germoplasma local y los programas de mejoramiento [12].

El germoplasma de arroz cultivado de Argentina se caracteriza generalmente por moderada a alta sensibilidad a la piriculariosis. Por lo tanto, la resistencia a *Po* es uno de los objetivos más importantes de los programas de mejoramiento de arroz. La eficiencia de un conjunto de genes *RPo* contra los patotipos presentes en la región arroceras de Argentina fue analizada por inoculación artificial [10, 11] utilizando líneas diferenciales internacionales y líneas isogénicas que portan distintos genes *RPo*. Esto permitió identificar genes que actuarían eficientemente en el control de razas nativas del patógeno presente en la región arroceras Argentina. La variación alélica de los MM adecuados para la introgresión de algunos de los genes *RPo* utilizados comúnmente en los programas de mejoramiento en todo el mundo, fue eva-





luada en un conjunto de 64 variedades del germoplasma argentino de arroz. Se encontraron combinaciones polimórficas que permiten la introgresión de estos genes de resistencia de amplio espectro en fondos genéticos susceptibles, confirmando de este modo el potencial de los marcadores identificados para la selección asistida por marcadores moleculares [14]. Con el objetivo de caracterizar el germoplasma de arroz de Argentina en relación con su resistencia a *Po*, se analizó la frecuencia de los genes *R_{Po}* caracterizados en el germoplasma de arroz y en las variedades de origen argentino en relación a la frecuencia de los correspondientes genes *Avr* en la población nativa del patógeno [14].

El desarrollo y aplicación de métodos simples de monitoreo de la virulencia del patógeno así como de los genes *R_{Po}* de las variedades sembradas a nivel comercial, permite acelerar la acumulación de datos epidemiológicos de la interacción huésped-patógeno presente en las zonas de cultivo y contribuir al desarrollo de estrategias de control de la enfermedad [7]. En nuestro grupo se ha realizado la caracterización de genes *Avr* presentes en cepas de *Po* aisladas de las áreas de producción de arroz en Argentina. Para ello se analizaron 50 aislamientos nativos del patógeno, identificados genéticamente y por virulencia, representativos de una colección de 161 aislamientos obtenidos a partir de muestras de 9 variedades comerciales y 6 líneas experimentales [10, 11]. Se caracterizó la variación alélica de tres genes *Avr* (*Avr-Pita1*, *Ace1* y *AvrPiz-t*) en las 50 cepas. Siete alelos *Avr-Pita1* se secuenciaron detectando 4 haplotipos diferentes.

Para identificar los genes de defensa implicados en la resistencia de amplio espectro, se utilizó la técnica de hibridación sustractiva por supresión para generar una biblioteca de DNAC enriquecida en transcritos que se expresan diferencialmente en la interacción entre el aislamiento nativo de *Po* FCC40 y el genotipo de arroz que porta el gen de resistencia *Pi33* (respuesta incompatible) y su fondo genético susceptible (respuesta compatible). Fueron secuenciados y analizados ochenta clones de DNAC, de los cuales 58 presentaron homología de secuencia significativa con genes conocidos y 20 resultaron homólogos a 16 genes de función desconocida. El análisis de los patrones de expresión por “Northern blot” de 10 clones de DNAC demostró que la mayoría de estos genes fueron inducidos o reprimidos después de la infección con *Po*, y que la mitad de ellos mostraron patrones de expresión diferencial entre la interacción incompatible y compatible.





En conclusión, en este proyecto mediante la aplicación de nuevas tecnologías, se realizaron estudios de caracterización molecular del germoplasma de arroz de Argentina y de la población nativa de *Po*, y se caracterizó su interacción para generar información de utilidad para los mejoradores de arroz de nuestro país que les permitiera el desarrollo de variedades con resistencia duradera a la piriculariosis.

POTENCIALIDADES DE LA LINEA DE ESTUDIO

El abordaje metodológico integral del patosistema en el que se estudia conjuntamente el patógeno, la planta huésped y su interacción, haciendo uso de herramientas biotecnológicas es novedoso en nuestro país y sienta las bases para su aplicación a otros sistemas planta-patógeno que permitan aplicar un enfoque similar. El objetivo es identificar genes del germoplasma regional, de manera de disminuir la dependencia de las variedades desarrolladas y de los genes aislados en países del primer mundo y buscar soluciones para problemas propios de la región, que difícilmente pueden ser enfrentados por programas de mejoramiento genético ajenos a la misma.

El desarrollo de las metodologías de estudio aplicadas al sistema modelo arroz-*Po* nos ha permitido establecer en nuestro laboratorio las capacidades necesarias, tanto a nivel de formación de recursos humanos como a nivel de desarrollos tecnológicos para poder transferir la experiencia acumulada al estudio de otros patosistemas.

OFERTA TECNOLÓGICA

En nuestro laboratorio se cuenta con las herramientas necesarias y el personal entrenado para realizar el aislamiento, la identificación y la conservación de hongos fitopatógenos, como así también se cuenta con la capacitación y el equipamiento adecuado para la identificación taxonómica, la caracterización morfológica, bioquímica y molecular de los mismos. La generación de esta información complementada con estudios realizados en la identificación de genes de resistencia resulta de gran utilidad para el desarrollo de estrategias de control de enfermedades fúngicas. En nuestro laboratorio también se realiza el diagnóstico molecular de enfermedades fúngicas transmitidas por ejemplo a través de las semillas (ej. diagnóstico de *Septoria tritici* en trigo) utilizando la técnica de PCR.





Las aplicaciones de los MM en la evaluación de germoplasma incluyen entre otras aplicaciones, la determinación de la pureza de lotes de semillas híbridas, la selección adecuada de los parentales para el desarrollo de nuevos cultivares, la verificación de pedigrí, la evaluación del nivel de diversidad genética de un dado germoplasma, la reproducción del material y la asignación de líneas a grupos heteróticos específicos, la identificación y purificación varietal en la protección de variedades vegetales, y el manejo de Bancos de Germoplasma para la conservación y propagación de las colecciones. Todas estas aplicaciones facilitan el uso eficiente de los recursos genéticos disponibles y la adecuada conservación del germoplasma. En relación a la aplicación de MM, nuestro grupo desarrolló un proyecto de vinculación tecnológica FIBA – RiceTec, para la “Determinación de pureza de híbridos de arroz con marcadores moleculares”.





REFERENCIAS

1. Khush, GS, (2005) What it will take to feed 5,0 billion rice consumers in 2030. *Plant. Molecular Biology* 59(1):1–6.
2. Ebbole DJ, (2007) *Magnaporthe* as a model for understanding host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol* 45:437–456.
3. Couch BC, Kohn LM (2002) A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia* 94(4):683–693.
4. Oerke EC, Dehne HW, Schonbeck F, Weber A (1994) *Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 808pp.
5. Khush GS, Jena KK (2009) Current status and future prospects for research on blast resistance in rice (*Oryza sativa* L.). In: Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease, pp 1–10. Wang G-L, Valent B (eds). Springer Science.
6. Koeck M, Hardham AR, Dodds PN (2011) The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cell Microbiol* 13(12):1849–1857.
7. Koizumi S (2009) *Blast race monitoring for stable use of blast resistance in rice* eds Wang GL, Valent B Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease. (Springer, Heidelberg) pp 239–246.
8. Dai Y, Jia Y, Correll J, Wang X, Wang Y (2010) Diversification and evolution of the avirulence gene AVR-Pita1 in field isolates of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol* 47(12):973–980.
9. Zeigler RS, Thome J, Nelson R, Levy M, Correa-Victoria F (1994) *Lineage exclusion: a proposal for linking blast population analysis to resistance breeding*. eds Zeigler RS, Leong SA, Teng PS. Rice blast disease, (CAB International, Wallingford, England, UK) pp 267–292.
10. Livore AB (2005) Desarrollo de una estrategia para la obtención de resistencia durable a *Pyricularia grisea* en Arroz en el Cono Sur. Informe técnico final – proyecto FONTAGRO – convenio IICA/BID FTG/RF-99-02-RG. En: PROCISUR Online (http://www.procisur.org.uy/online/proyectos_fontagro_pyricularia.asp).
11. Consolo VF (2006) Caracterización de poblaciones nativas de *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., teleomorfo *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr. en Ar-





- gentina, importante patógeno del cultivo de arroz. Tesis doctoral FCEyN-UNMdP.
12. Consolo VF, Cordo CA, Salerno GL (2008) DNA fingerprint and pathotype diversity of *Pyricularia oryzae* populations from Argentina. *Aust Plant Pathol* 37(4):357-364.
 13. Giarrocco LE, Marassi MA, Salerno GL (2007) Assessment of the Genetic Diversity in Argentine Rice Cultivars with SSR Markers. *Crop Sci* 47(2):851-858.
 14. Giarrocco LE (2013) Caracterización molecular de la interacción planta-patógeno en el sistema modelo arroz-*Pyricularia grisea*. Tesis doctoral FCEyN-UNMdP.







3:

ENTOMOLOGÍA APLICADA







CAPÍTULO 9

Control biológico de poblaciones de mosquitos de importancia en salud pública

Leonardo M. Díaz-Nieto, Rocio de la Paz Lopez, Corina M. Berón

Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (INBIOTEC-CONICET), y Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
cberon@fiba.org.ar

RESUMEN

Dentro del orden Diptera se encuentra el mayor número de insectos vectores de enfermedades humanas. Entre ellos los mosquitos constituyen un grupo numeroso y son responsables de la transmisión de diversos patógenos tales como virus y parásitos. La actividad hematófaga, la capacidad de transmisión de agentes patógenos para el humano, y la distribución geográfica, los hacen insectos que merecen un estricto control sanitario, especialmente en los casos de enfermedades para las que no existen vacunas disponibles y para las que la única forma de control epidemiológico es el control de las poblaciones de vectores.

En esta línea de investigación se trabaja en la búsqueda de nuevos patógenos que puedan ser utilizados como agentes de control de poblaciones de mosquitos de importancia sanitaria a nivel regional. En este contexto, este grupo ha llevado a cabo el monitoreo de especies de mosquitos en Mar del Plata y alrededores y ha realizado su determinación por medio de metodologías de taxonomía clásica y molecular. Los objetivos fundamentales son conocer cuáles son las especies de vectores de importancia sanitaria en la ciudad de Mar del





Plata y zonas aledañas para, a partir de esa información, poder plantear acciones de manejo y control de las poblaciones de mosquitos que realmente signifiquen riesgo sanitario. Por otro lado, se realiza la búsqueda de agentes patógenos o parásitos que infecten naturalmente a estos insectos y que a su vez puedan ser utilizados para el desarrollo de bioinsecticidas. De esta manera, se han logrado identificar bacterias entomopatógenas, endosimbiontes y nutricionales, así como nematodos y virus. Estos organismos están siendo identificados y caracterizados biológica, molecular y toxicológicamente. En particular, a partir de los estudios de detección de cepas de la bacteria endosimbionte *Wolbachia pipientis* en las poblaciones de mosquitos presentes en la región, se espera evaluar su impacto en la manipulación de la reproducción de estas especies de vectores y analizar la posibilidad de implementar poblaciones de mosquitos portadores de *Wolbachia* en las estrategias de manejo integrado de poblaciones de estos insectos. Por otro lado, se está llevando a cabo la caracterización de una cepa nativa del patógeno *Bacillus thuringiensis* aislada previamente, que presenta elevada actividad tóxica contra algunas especies de mosquitos de los géneros *Aedes*, *Culex* y *Ochlerotatus*. Se ha logrado determinar que esta cepa contiene diversas toxinas y se está trabajando en el desarrollo de mutantes derivadas de esta bacteria, portadoras de cada una de las toxinas individuales que permitirán posteriormente evaluar la actividad tóxica de cada una de ellas. Asimismo se va a investigar si las distintas toxinas tienen actividad sinérgica entre ellas y/o con proteínas tóxicas presentes en la cepa de uso comercial (*B. thuringiensis* spp. *israelensis*), y de esta manera desarrollar un producto de toxicidad mayor y menor costo que otros insecticidas disponibles en el mercado local. A partir de estas investigaciones se espera generar herramientas que permitan, en etapas posteriores, el desarrollo de productos basados en la incorporación de toxinas mosquitocidas en organismos de vida libre y/o microorganismos relevantes en la nutrición de larvas de mosquitos, y de esta manera aumentar la vida media del producto en el campo, así como, la eficiencia de la aplicación de los formulados.





INTRODUCCIÓN

Los insectos de importancia sanitaria son aquellos que participan en la transmisión de parásitos o agentes patógenos a los seres humanos u otros vertebrados. La transmisión biológica es llevada a cabo por insectos que reciben el nombre de vectores, dentro de ellos, los microorganismos se multiplican y en algunos casos desarrollan parte de su ciclo de vida. La mayoría de los insectos vectores son hematófagos, y adquieren y transmiten los agentes patógenos cuando se alimentan.

En particular, los mosquitos [Diptera: Culicidae] han sido objeto de intensos estudios desde fines del siglo XIX, cuando se relacionan por primera vez con la transmisión de agentes patógenos para el hombre y otros vertebrados. Desde hace más de un siglo, se sabe que los mosquitos son vectores de patógenos causantes de enfermedades eventualmente mortales tales como malaria, dengue, fiebre amarilla, diversas encefalitis y filariasis [1]. Sin embargo, las tasas de mortalidad y morbilidad asociadas a estos patógenos aún se mantienen altas en países de las regiones tropicales y subtropicales. De acuerdo con las estimaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de la mitad de la población mundial se ve afectada por enfermedades transmitidas por mosquitos, dando como resultado millones de muertes y cientos de millones de casos cada año [2].

Entre los principales géneros de mosquitos vectores de patógenos de la familia Culicidae se encuentran *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* y *Ochlerotatus* [1]. En Argentina existen representantes de todos estos géneros y se ha demostrado que algunas de estas especies son vectores de diversos agentes patógenos, tales como el virus Dengue, el virus de la encefalitis de San Luis, el virus UNA, el virus de Río Negro, entre otros [3].

La única manera de evitar la emergencia/reemergencia de enfermedades vectorizadas por estos artrópodos es a través de la erradicación de los insectos o mediante estrategias que involucren la disminución/eliminación de la carga de patógenos en ellos. En el caso particular de *Aedes aegypti*, hasta 1980, el avance del control/eliminación de este culícido se había restringido a áreas del Caribe, Centroamérica y las Antillas, y a partir de este máximo resultado de control, sobrevino la reinfestación de países con erradicación concluida. La resistencia del mosquito a muchos insecticidas, el agravamiento de la situación con dengue y fiebre amarilla y la grave coyuntura económica a nivel regional,





fueron los factores responsables del deterioro de los programas de manejo de estos insectos (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/index.htm>).

La mayor dificultad en el control de las poblaciones de mosquitos está dada por sus grandes posibilidades de adaptación a un amplio rango de hábitats diferentes. Las hembras adultas pueden oviponer en diversas condiciones. A su vez las larvas pueden desarrollarse y subsistir en una amplia variedad de cuerpos de agua, temporarios o permanentes, altamente contaminados o cristalinos, estancados o fluentes, acumulados en grandes lagunas o en charcos, floreros, neumáticos viejos, huellas de ganado, axilas de hojas o huecos de árboles. Por otro lado, los adultos pueden variar extremadamente su bionomía con respecto de la búsqueda de hospedador, vuelo y migración, así como en cuanto a sus estrategias de reproducción [1].

Los controles sanitarios de las poblaciones de mosquitos se han realizado durante años por medio de productos de síntesis química. Desde hace varios años es conocido el desarrollo de resistencia a este tipo de biocidas por parte de las poblaciones de insectos, dado principalmente por los cortos tiempos generacionales. Además, este tipo de productos tienen implicancias negativas para el medio ambiente y, en particular, existe una presión cada vez mayor por parte de la opinión pública sobre el uso de productos contaminantes. El principal ejemplo de ello lo constituyó el uso del DDT, con gran éxito durante décadas y finalmente prohibido en EEUU y en otros países por sus efectos carcinogénicos y teratogénicos en vertebrados [4].

Una de las opciones más promisorias al uso de insecticidas químicos ha sido y continúa siéndolo, el empleo de bacterias entomopatógenas en el control de insectos dañinos, siendo las especies *Lysinibacillus sphaericus* (Ls) y *B. thuringiensis* subespecie *israelensis* (Bti), específicamente tóxicas contra mosquitos.

Desde el descubrimiento e identificación de Bti en 1977, este agente se ha desarrollado como una alternativa para el control de mosquitos y en la actualidad existen productos comerciales para tal fin. Las toxinas presentes en las cepas mosquitocidas de *B. thuringiensis* se dividen en dos grupos: la familia de las proteínas cristal (Cry) y la familia de las proteínas Cyt, citolíticas y hemolíticas, menos tóxicas que las Cry pero que contribuyen a la toxicidad ya que sinergizan su acción. Numerosos estudios han demostrado que el amplio espectro de actividad mosquitocida, así como sus altos niveles de toxicidad, se deben a la interacción sinérgica entre la proteína Cyt1Aa y las proteínas Cry. Por otro lado, las toxinas Bin, presentes en cepas de *L. sphaericus*, actúan de una





forma muy similar, uniéndose específicamente a proteínas receptoras presentes en el intestino del insecto blanco [5].

A nivel mundial existen pocos grupos que trabajan en el control de mosquitos vectores de enfermedades humanas por medio de diversas bacterias entomopatógenas como *B. thuringiensis* spp. *israelensis*, *medellin* y *jegathesan*, así como *L. sphaericus*. Sin embargo, Bti es el bioinsecticida de elección en programas mundiales para el control de mosquitos (género *Aedes*) y jejenes (*Simulium*). El uso de este agente en programas de control de *A. aegypti* demuestra que constituye una alternativa efectiva para el control larval de una amplia variedad de especies de culícidos en criaderos naturales o artificiales, ya que la mayoría de las poblaciones de mosquitos en cuerpos de agua naturales que han sido expuestas a aplicaciones repetidas de este biolarvicida durante varios años, no han desarrollado resistencia a la bacteria. Sin embargo, para algunas especies de culícidos como *Culex pipiens* se han reportado niveles de resistencia a Bti en poblaciones aisladas en la región de New York [6].

L. sphaericus también ha sido muy usada en el control de larvas de mosquitos del género *Culex*; sin embargo, algunas poblaciones de estos insectos han presentado resistencia a su acción tóxica [5]. El desarrollo de resistencias observadas en las poblaciones de mosquitos en condiciones de laboratorio y de campo para algunas subespecies de *B. thuringiensis* ha llevado a incrementar la búsqueda de nuevas cepas de Bt y otras especies de bacterias entomopatógenas contra mosquitos.

Ensayos realizados en condiciones de laboratorio han demostrado que combinando toxinas de una cepa de Ls con una de las proteínas de Bti (Cyt1Aa) contra mosquitos-Ls resistentes, se recupera la actividad mosquitocida, de la misma manera que diferentes combinaciones de toxinas expresadas en una bacteria recombinante pueden tener efectos sinérgicos. Por otra parte, estudios sobre elementos regulatorios involucrados en la síntesis de toxinas permitió demostrar que se puede manipular Bti y aumentar significativamente la expresión de sus toxinas [7]. La combinación de toxinas comerciales con toxinas aisladas de cepas nativas permitirá aumentar el espectro de acción de estas proteínas contra insectos de importancia sanitaria regional de géneros de culícidos tales como *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Ochlerotatus* y *Psorophora*.

Un tipo de producto biotecnológico de reciente desarrollo, es el uso de organismos genéticamente modificados que puedan resultar más efectivos al momento de su aplicación, como podrían ser algunos microorganismos de im-





portancia nutricional durante el desarrollo de los mosquitos. En particular, se han obtenido cianobacterias modelo genéticamente modificadas, que expresan toxinas de tipo Cry4 y Cry11. Algunas de ellas inclusive han sido patentadas en EEUU en los años 90 (<http://www.patentstorm.us/patents/6503500-claims.html>). Pero las cianobacterias modelo no tienen capacidad de sobrevivir en los ambientes naturales. Recientemente se han realizado algunos trabajos en los que se aíslan cianobacterias de vida libre, capaces de sobrevivir en habitats naturales y que a su vez son alimento de las larvas de mosquitos [8], brindando de esta manera estabilidad a la toxina expresada intracelularmente. Para que esta metodología sea realmente efectiva es fundamental trabajar con especies nativas de las regiones en las que se pretende realizar el control de los vectores.

Por otro lado, se ha determinado recientemente que algunas bacterias endosimbiontes obligatorias de insectos podrían constituir nuevos agentes de control capaces de potenciar y mejorar los sistemas de manejo de enfermedades transmitidas por mosquitos. En particular, la bacteria *Wolbachia pipiens*, -proteobacteria identificada inicialmente en ovarios de mosquitos del género *Culex* por Hertig y Wolbach en 1924, ha sido caracterizada como el agente causal de incompatibilidad citoplasmática, lo que provoca en este grupo de insectos una producción aberrante de la progenie originada por el cruzamiento entre machos infectados con hembras no infectadas. Los machos infectados con esta bacteria hospedan factores citoplasmáticos que afectan el movimiento de los cromosomas en los espermatozoides después de la fertilización. Como resultado de ello los cromosomas paternos son eliminados produciéndose embriones haploides, no viables [9]. En la estrategia de control de vectores por medio de *Wolbachia* se propone mantener la “esterilidad” reproductora artificialmente como resultado del cruce de machos infectados con una cepa de incompatibilidad con hembras de las poblaciones naturales. En forma análoga a la técnica de insecto estéril, el resultado será la disminución sostenida de la población vector, resaltando en este caso que los mosquitos machos no se alimentan de sangre, por lo tanto, no son vectores de enfermedades ni transmisores de esta bacteria. Especies de *Wolbachia* han sido detectadas en mosquitos de los géneros *Culex* y *Aedes* y se ha utilizado la técnica de microinyección sincicial embrionaria para introducir cepas de *Wolbachia* parásitas de *Aedes albopictus* en *A. aegypti* [10]. También ha sido detectada una cepa de *Wolbachia* capaz de inducir mortalidad en machos de *C. pipiens*. Por otro lado, investigaciones recientes reportan el efecto de diversas cepas de *Wolbachia* sobre los patógenos





transmitidos por mosquitos de los géneros *Aedes* y *Anopheles*. Mosquitos infectados con *Wolbachia* se convierten en refractarios de estos patógenos (por ejemplo de *Plasmodium* spp., de nemátodos filariales, de virus, etc.). Esto es debido a que la presencia de *Wolbachia* induce la expresión de numerosos genes del sistema inmune del mosquito [11].

Dado que se ha demostrado que algunas toxinas bacterianas pueden sinergizar la actividad mosquitocida de otras cepas, y tal sinergismo podría suprimir o demorar la resistencia [5], nos resulta de interés plantear la posibilidad de combinar toxinas de cepas de *B. thuringiensis* nativas, así como la actividad de control de mosquitos utilizando cepas nativas de *Wolbachia*, contra mosquitos locales. El desarrollo de investigaciones tendientes a seleccionar y caracterizar nuevas cepas de bacterias entomopatógenas, la caracterización de los genes que codifican las toxinas específicas así como la incorporación de cepas de bacterias endosimbiontes, será un importante aporte al control de vectores de enfermedades humanas y el manejo de resistencias generadas por aplicaciones de bioformulados durante largos períodos de tiempo.

RESULTADOS OBTENIDOS

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado el monitoreo de las especies de mosquitos de importancia sanitaria en la ciudad de Mar del Plata y alrededores a lo largo de un período de tres años, con el objetivo buscar bacterias patógenas y simbiontes a partir de los mosquitos de interés sanitario a nivel regional, pero nos encontramos con un vacío de información en cuanto a las especies de mosquitos presentes, y potencialmente peligrosas, en la zona. Por lo tanto, se abordó científicamente el monitoreo de especies de mosquitos vectores de enfermedades humanas y animales, por primera vez, en el Partido de General Pueyrredon, y fue la primera vez que se realizó en el país la identificación molecular de especies de estos insectos. Para cumplir con estos objetivos, se han utilizado métodos clásicos, como es la identificación por medio de caracteres morfológicos por medio de claves taxonómicas (a partir de larvas de cuarto estadio y hembras adultas criadas en el laboratorio) y se ha realizado la identificación molecular de las especies, utilizando para ello la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de dos genes de interés [el codificante de la subunidad ribosomal (DNAr 18S) y de la citocromo *c* oxidasa I mitocondrial (COI)], que han sido secuenciados y debidamente depositados





en el Genbank. De esta manera se han identificado 14 especies correspondientes a 4 géneros [12]. Este análisis permitió determinar las especies de mayor abundancia y distribución en la zona y a partir de insectos colectados a campo se logró instalar un insectario en el que se ha establecido la cría de 2 especies de mosquitos, *C. pipiens* y *Culex apicinus*, lo que nos permite realizar los ensayos de toxicidad de los patógenos aislados.

Por otro lado, se realizó el monitoreo de la especie *A. aegypti* en los alrededores de la ciudad de Mar del Plata y de las Rutas Provincial N° 2 y Nacionales N° 11 y 226, dando como resultado la detección de este mosquito por primera vez en algunas localidades de la provincia de Buenos Aires [13]. Para analizar la migración de estas poblaciones se están realizando estudios de filogeografía, a partir de la amplificación, secuenciación y análisis de un fragmento de la subunidad 5 del gen mitocondrial NADH-dehidrogenasa (ND5) que será comparado con datos obtenidos anteriormente en otros puntos del país, tales como Capital Federal, Córdoba y otros [14].

A partir de larvas de mosquitos de las diferentes especies colectadas en el campo en los diferentes muestreos se han iniciado actividades vinculadas con la detección y caracterización de bacterias cultivables y no cultivables en diversas especies de mosquitos. También se ha detectado la presencia de cepas nativas de *Wolbachia* en las especies de mosquitos de la zona de estudio y, de acuerdo a su identificación molecular, se ha determinado que las secuencias nucleotídicas caracterizadas son diferentes de otras ya registradas en las bases de datos públicas. A partir de los insectos de cría en condiciones de laboratorio se han realizado ensayos de toxicidad con las cepas de las bacterias nativas aisladas, la determinación de las preferencias nutricionales de *C. pipiens* y se realizan ensayos para caracterizar la interacción hospedador – simbiote (nutricional), tal como se observa en la Figura 1A–C.

A partir de larvas colectadas en el campo también se ha realizado la detección de virus (Fig. 1D) y nematodos (Fig. 1E) que provocan enfermedad y muerte tanto a las larvas de las que fueron aisladas como a larvas sanas de la cría en laboratorio de *C. pipiens*. Estos patógenos están siendo caracterizados morfológica y molecularmente, y se analiza su potencialidad como agentes de control de mosquitos de diversas especies.

Por otro lado, se está realizando la caracterización molecular de la cepa nativa de *B. thuringiensis* FCC 41 descrita por nuestro grupo [15], y que presenta alta toxicidad contra diversas especies de mosquitos, tales como *A. aegypti*,



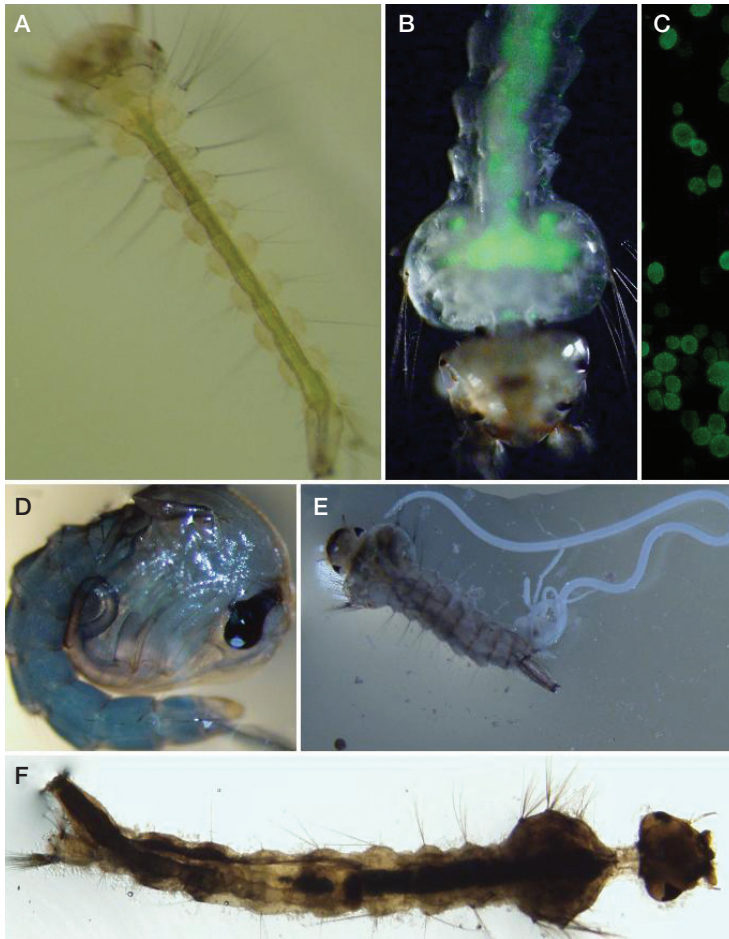


Figura 1. Microorganismos, nematodos y virus en estados inmaduros de mosquitos.

A y B) Determinación del rol nutricional de diferentes microorganismos en larvas de *C. pipiens*. A) Larvas alimentadas con la microalga *Chlorella sorokiniana*. B) Larvas alimentadas con células de *Saccharomyces cerevisiae* marcadas con la proteína fluorescente (GFP). C) Detalle de células de la levadura *S. cerevisiae* GFP+. D) Pupa de *C. pipiens* infectada con un virus de la familia Iridoviridae. E) Larva de *C. pipiens* infestada con el nematodo *Strelkovimermis spiculatus*. F) Larva de *A. aegypti* infectada con una cepa nativa de *B. thuringiensis*. Las imágenes de larvas y pupas fueron capturadas bajo microscopía estereoscópica a 16,3 aumentos de magnificación, mientras que las imágenes de *S. cerevisiae* fueron capturadas bajo microscopía de epifluorescencia a 1.500 aumentos de magnificación.





C. pipiens, *C. apicinus* y *O. albifasciatus* (Fig. 1F). A partir de esta cepa nativa se realizan estudios para determinar si las nuevas toxinas que sintetiza presentan actividad sinérgica entre ellas, como también con las proteínas Cry y Cyt presentes en la cepa de uso comercial Bti. De esta manera se podría desarrollar un producto de toxicidad y espectro de acción mayor, así como de menor costo que otros productos disponibles en el mercado.

PERSPECTIVAS

Las investigaciones llevadas a cabo por este grupo de investigación generan herramientas que nos permitirán, en etapas posteriores, realizar estudios que conduzcan al desarrollo de productos mosquitocidas basados en la incorporación de las nuevas toxinas Cry presentes en cepas nativas en organismos de vida libre, como microorganismos de importancia nutricional en estos insectos, y de esta manera aumentar la vida media del producto en el campo así como la eficiencia de la aplicación del formulado, se investigan también organismos tales como virus y nematodos.

El conocimiento de nuevas cepas de microorganismos patógenos, nutricionales que expresen entomotoxinas, y/o simbioses, virus y nematodos permitirá el desarrollo de productos bioinsecticidas específicos y eficientes para el control de insectos de interés sanitario y se proponen como estrategias que contribuirán a la demora en la evolución de las resistencias por parte de estos insectos vectores, así como su aplicación en el marco de su manejo integrado.

OFERTA TECNOLÓGICA

Desde 2005 nuestro grupo ha realizado Servicios Tecnológicos de Alto Nivel vinculados al desarrollo de productos biológicos para el control de mosquitos. Se cuenta con la experiencia y capacidades tecnológicas para realizar asesoramiento a empresas productoras de bioinsecticidas basados en la formulación de cepas de la bacteria *B. thuringiensis*, así como en el desarrollo de ensayos de toxicidad para la evaluación de la actividad biológica de los productos mosquitocidas desarrollados. Por otro lado, se cuenta con las herramientas necesarias para realizar el monitoreo de especies de mosquitos de importancia sanitaria, así como de su identificación por medio de herramientas taxonómicas morfológicas como moleculares.





REFERENCIAS

1. Becker N, Petrić D, Zgomba M, Boase C, Dahl C, Lane J, Kaiser A (2003) Mosquitoes and their control. Kluwer Academic/ Plenum Publishers New York. 498 pp.
2. Forshey BM, Guevara C, Laguna-Torres VA, Cespedes M, Vargas J, Gianella A, Vallejo E, Madrid C, Aguayo N, Gotuzzo E, Suarez V, Morales AM, Benigolea L, Reyes N, Perez J, Negrete M, Rocha C, Morrison AC, Russell KL, Blair PJ, Olson JG, Kochel TJ; NMRCD Febrile Surveillance Working Group (2010) Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000–2007. *PLoS Negl Trop Dis* 4(8):e787.
3. Sabattini MS (2010) Importancia actual de los arbovirus en Argentina. *Temas de Zoonosis IV, Veterinaria Argentina* 4:266.
4. Mellanby, K (1992) The DDT story. British Crop Protection Council, Surrey.
5. Federici BA, Park HW, Bideshi DK, Wirth MC, Johnson JJ, Sakano Y, Tang M (2007) Developing recombinant bacteria for control of mosquito larvae. *J Am Mosq Control Assoc* 23(s2):164–175.
6. Park HW, Delécluse A, Federici BA (2001) Construction and characterization of a recombinant *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strain that produces Cry11B. *J Invertebr Pathol* 78(1):37–44.
7. Lacey LA (2007) *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc* 23(2 Suppl):133–163.
8. Zaritsky A, Ben-Dov E, Borovsky D, Boussiba S, Einav M, Gindin G, Horowitz AR, Kolot M, Melnikov O, Mendel Z, Yagil E (2010) Transgenic organisms expressing genes from *Bacillus thuringiensis* to combat insect pests. *Bioeng Bugs* 1(5):341–344.
9. Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O'Neill SL (2011) *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Rep* 12(6):508–518.
10. Braig HR, Guzman H, Tesh RB, O'Neill SL (1994) Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. *Nature* 367(6462):453–455.
11. Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL (2009) A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* 139(7): 1268–1278.





12. Díaz-Nieto LM, Maciá A, Farina JL, Parisi G, Vidal Domínguez ME, Perotti MA, Berón CM (2013) Distribution of Mosquitoes in the South East of Argentina and First Report on the Analysis based on 18S rDNA and COI Sequences. *PLoS ONE* 8(9):e75516.
13. Díaz-Nieto LM, Maciá A, Perotti MA, Berón CM (2013) Geographical limits of the Southeastern distribution of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Argentina. *PLoS Negl Trop Dis* 7(1):e1963.
14. Albrieu Llinás G, Gardenal CN (2012) Phylogeography of *Aedes aegypti* in Argentina: long-distance colonization and rapid restoration of fragmented relicts after a continental control campaign. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12(3):254–261.
15. Berón CM, Salerno GL (2007) Cloning and characterization of a novel crystal protein from a native *Bacillus thuringiensis* isolate highly active against *Aedes aegypti*. *Curr Microbiol* 54(4):271–276.





CAPÍTULO 10

Biodiversidad de los insectos de suelo de áreas protegidas y agroecosistemas de la provincia de Buenos Aires y su utilización como herramientas de gestión y manejo

Armando C. Cicchino^{1,2}, Darío P. Porrini^{1,2}, Adela V. Castro^{1,2},
Juan M. Arcusa³, Diego L. Carpintero⁴, Juan L. Farina⁵

¹GENEBSO-INBIOTEC-CONICET

²Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata

³Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires

⁴Museo de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”

⁵Museo Municipal de Ciencias Naturales “Lorenzo Scaglia”

cicchino@copetel.com.ar

RESUMEN

El avance de la frontera agropecuaria y la creciente urbanización sobre la región pampeana ocasiona a menudo modificaciones irreversibles de los ambientes prístinos y naturales, mayormente bajo dominio privado de la tierra y con escasa o nula protección legal, generando severas limitaciones para la conservación, biorremediación o recupero de los mismos. Dentro de este contexto, las líneas de investigación de los distintos integrantes del GENEBSO apuntan al conocimiento y desarrollo de herramientas biológicas de gestión y manejo asegurando la biodiversidad de las áreas protegidas actuales y a su vez





a un manejo sustentable de las mismas en términos de producción agropecuaria o agroindustrial, manteniendo y monitoreando los servicios ecosistémicos mediante herramientas entomológicas específicas consistentes en grupos de insectos cuyas respuestas son prácticamente lineales, sensibles y fácilmente detectables frente a las distintas variables bióticas y de manejo, todos de amplio uso y que cuentan con una frondosa historia y cuantiosa literatura a nivel internacional para estos propósitos. Entre ellos se destacan los insectos coleópteros de la familia Carabidae, hormigas (Formicidae), distintas chinches edáficas (Hemiptera) y, eventualmente, también arañas (Araneida). Su participación en las redes tróficas los ubica entre los enemigos naturales de plagas agrícolas, convirtiéndose también en una importante herramienta para la producción agroecológica por su sencillo monitoreo espacial y temporal. Y en este sentido, el GENEBSO cuenta con importantes antecedentes previos, evaluando -entre otros- la biodiversidad y composición específica de la entomofauna en diferentes áreas protegidas nacionales, provinciales y municipales, así también como predios ocupados por chacras y microemprendimientos familiares en el marco de diferentes convenios interinstitucionales, contando hoy con la infraestructura, material humano y experiencia necesarias para continuar prestando cooperaciones y servicios a terceros de similar tenor.





INTRODUCCIÓN

Los coleópteros de la familia Carabidae integran una de las tres familias más diversificadas de este orden de insectos, y tanto por su diversidad como por su abundancia, variedad de roles tróficos, modos de vida, longevidad y biomasa constituyen una fracción importante de toda la biota edáfica [1-5]. Por estas razones, las modificaciones que se operan en los distintos ensambles de especies de esta familia, a distintos niveles de escala, son considerados como excelentes indicadores biológicos del estado sucesional de los ambientes edáficos [1, 6, 7], siendo entonces de gran importancia en el seguimiento y monitoreo en programas de biorremediación o restauración de ambientes degradados o modificados [7, 8]. No obstante, para poder ser utilizados como herramientas fiables de gestión y manejo de distintos ecosistemas, es necesario un conocimiento preciso de las especies individuales, así también como de su modo de vida, requerimientos microambientales y principales preferencias de hábitat, materias que constituyen los principales objetivos del GENEBSO, extendidos hoy también a otros dos grupos taxonómicos de similar importancia, tales como son los hemípteros y formícidos.

Desde su creación el 17 de febrero de 2005 (OCA N° 1012 de la UNMDP), los distintos integrantes de este grupo de investigación paulatinamente se han abocado al conocimiento pormenorizado de la entomofauna de áreas protegidas y agroecosistemas propios del cuadrante sudeste de la provincia de Buenos Aires, centrado primariamente en insectos Coleópteros de las familias Carabidae y Aphodiidae, a los que se añadieron más recientemente Himenópteros de la familia Formicidae y Hemiptera Heteroptera. A partir de 2011, el universo geográfico se hizo extensivo a toda la mitad oriental de dicha provincia. Por resolución 3061/13, de fecha 23 de agosto de 2013, el CONICET presta su conformidad para que el GENEBSO se incorpore al INBIOTEC como Grupo Vinculado, generándose a partir de esta fecha el desarrollo mancomunado de proyectos de investigación, formación de recursos humanos y servicios a terceros referidos a la temática que se ha venido desarrollando previamente, centrándose en el conocimiento e interpretación precisa y acotada de distintos aspectos de la biodiversidad y su utilización como eficaces herramientas de gestión, monitoreo y manejo de distintas áreas o agroecosistemas particulares, línea de investigación y desarrollo que ha sido específica y metodológicamente desarrollada para la provincia de Buenos Aires por los integrantes del GENEBSO a partir de su creación.





Tomando en consideración estos antecedentes, es nuestro propósito dar a conocer aquí de manera sumaria los métodos rutinariamente empleados en el desarrollo de los diferentes muestreos, en la identificación del material obtenido, en su catalogación y, finalmente, en el análisis de los datos, y su aplicabilidad a una casuística concreta o potencial.

METODOLOGÍA UTILIZADA

Métodos de colecta de los carábidos, hemípteros y formícidos

Muchos de los aspectos esenciales del modo de vida de los carábidos pertenecientes a las distintas faunas locales son realmente difíciles de estudiar, razón por la cual se han venido desarrollado distintas estrategias para poder develarlos *in vivo* y/o *in vitro*. Dentro de los primeros están los ensayos genéricamente denominados “de cafetería” (v.g. [2]), y para las pruebas con materiales fijados; para la obtención de estos últimos, habitualmente se recurre a distintos métodos de muestreo. Entre ellos, el más universalmente utilizado consiste en el uso de trampas de caída, denominadas “pitfall” [4], y a partir de cada muestra la separación de los ejemplares correspondientes a cada grupo.

Las trampas “pitfall” consisten en un pote cónico enterrado en el suelo de modo que la abertura quede unos 2-3 cm por debajo del nivel de la superficie del suelo y, normalmente, conteniendo aproximadamente la mitad de su volumen de líquido conservador, preferiblemente cromático, organoléptico y ambientalmente neutro, el cual se recambia periódicamente al extraer su contenido (Fig. 1). La disposición espacial se conforma en cada caso particular, integrando diseños muestrales dispuestos para cumplir con las exigencias estadísticas de práctica en estos casos. Estas trampas son dispositivos de captura pasivos, operando merced a la actividad locomotora de cada artrópodo particular. La abundancia y composición de las capturas está influenciada por el tamaño corporal y la capacidad de desplazamiento, forma, tamaño y material de la trampa, distribución espacial, tiempo de exposición efectivo, y la composición del líquido conservante, en adición a los factores que directa o indirectamente influyan en la actividad y comportamiento de los artrópodos [3]. Su aplicación presenta entonces algunas limitaciones, las que han sido ampliamente discutidas en la literatura especializada (v.g. [9]), aunque constituyen un método eficiente, económico y de simple utilización aun para personal poco entrenado





Figura 1. Distintas actividades de campaña y laboratorio llevadas a cabo en los muestreos efectuados por el GENEBSO.

A) Colocación de las trampas “pitfall”; B) recambio del contenido de las mismas, C) colecta de insectos en trampa de luz, D) colectas manuales con red (“sweeping”), E) limpieza y separación del material entomológico del contenido de cada “pitfall”, F) identificación específica de cada muestra, G) conteo y tabulación de los individuos capturados en cada muestra.





en trampeos entomológicos. Los datos generados representan la intensidad de la actividad locomotora de las distintas especies capturadas, representando su “densidad-actividad” y la estructura de dominancia o “actividad-dominancia” (v.g. [10]). La abundancia es un buen predictor de la *importancia cuantitativa* de las especies, sobre todo para las mayores a 4 mm de talla corporal [11]. Es de elección en relevamientos a distintos niveles de escala, en los cuales el objetivo principal es realizar un inventario cualitativo y comparación de ensambles, aunque en su interpretación deben tenerse en cuenta las características morfológicas y etológicas de cada especie particular [12].

En todos los casos se procuró obtener un inventario de especies lo más completo posible, utilizando para este propósito otros métodos de colecta complementarios del “pitfall”, como ser trampas de luz, tamizado, lixiviación y capturas manuales en los diferentes ambientes y atendiendo a los distintos horarios de actividad (diurnos, crepusculares, nocturnos) de los insectos (Fig. 1) [10].

Todos los ejemplares obtenidos por estos métodos de captura fueron conservados en etanol 70% o bien etanol-ácido acético 10% (3:1, vol/vol), según sean coleópteros u otros órdenes de insectos.

Identificación y repositorios del material entomológico obtenido

En el desarrollo de los distintos relevamientos llevados a cabo como proyectos de investigación institucional o como servicio a terceros sea a escala local o zonal, siempre se ha procurado llegar a la identificación de los materiales entomológicos al nivel taxonómico más bajo posible, a nivel de especie en la mayoría de los casos. Esto se cumplió recurriendo tanto a la experiencia personal de los investigadores de este grupo vinculado (Fig. 1), como a la utilización de claves específicas éditas o inéditas, sumado a la desinteresada ayuda prestada por otros entomólogos nacionales y del exterior.

Con el objetivo de normar los procedimientos que contribuyan a poner en orden el *status* taxonómico de los distintos taxones de interés –básicamente especies–, se ha recurrido a confeccionar la correspondiente *cartografía*, esto es, a una ficha sumaria electrónica que contiene la iconografía, descripción, principales rasgos bioetológicos, fenología estacional, ambientes preferenciales y literatura relevante de cada especie, así también como el período de aparición de individuos generales (aquellos con pocas horas o días de emergidos, con grado de pigmentación y quitinización débiles) y de larvas (Fig. 2). Para el



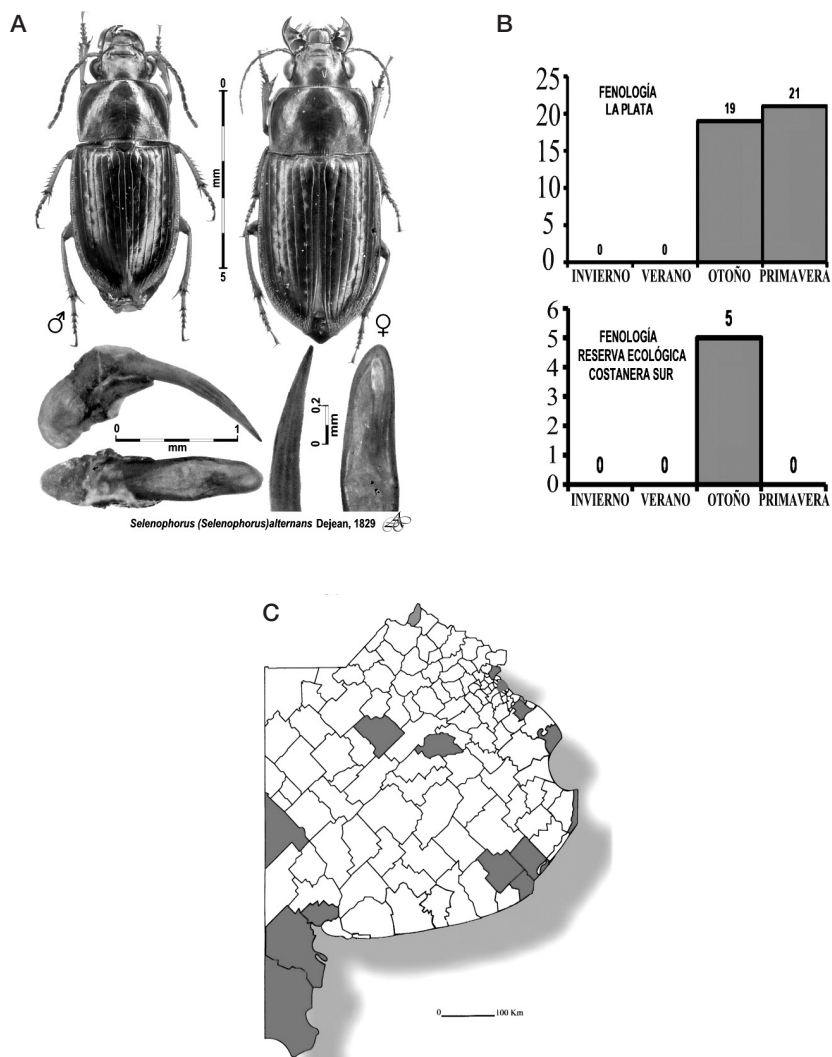


Figura 2. Algunos datos e infografía incluidos en la cartografía de cada especie.

A) iconografía del estado adulto y caracteres de los genitales masculinos externos, B) fenología de la especie en distintas localidades o regiones, C) mapa de distribución en la provincia de Buenos Aires, indicando los partidos en los cuales está presente.





caso de las Carabidae de la provincia de Buenos Aires (c.a. 350 especies), se ha cumplido con cerca del 60% de las especies, con el $\pm 50\%$ de las Hemiptera (≥ 750 especies) y se está comenzando con las Formicidae.

Finalmente, del total de especímenes identificados correspondientes a cada especie y localidad se separaron y prepararon “vauchers” mediante técnicas entomológicas convencionales, formándose colecciones de referencia para el GENEBSO, para el Museo Municipal de Ciencias Naturales “Lorenzo Scaglia” (Mar del Plata, Buenos Aires) y para Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” (Ciudad Autónoma de Buenos Aires, CABA).

Fenología

La fenología de las especies particulares tomadas a diferentes niveles de escala y en diferentes localidades del este de la provincia de Buenos Aires, puede variar entre diferentes hábitats [13]. Aun así, para más del 50% de las especies de Carabidae de esta área, y un porcentaje menor de Hemiptera y Formicidae, contamos con los datos fenológicos estacionales de más de una localidad, comprobando que muchas de ellas reflejan similar comportamiento en cuanto a su actividad (Fig. 2). De todos modos, aún son necesarios más estudios acerca de la actividad estacional de las diferentes especies en distintos hábitats, siguiendo un método estandarizado, como por ejemplo el propuesto por Fazekaset *al.* [11], útiles sobre todo para comparar si los patrones estacionales observados corresponden a la fenomenología ambiental rutinaria para esas estaciones, o bien si son respuesta a las condiciones ocasionales y contingentes con fenómenos como El Niño/La Niña, o bien eventos catastróficos locales o regionales tales como grandes incendios, inundaciones, diferente uso de la tierra o aun eventos de contaminación hídrica o edáfica.

Uso de los Carábidos, Hemípteros y Formícidos como organismos bioindicadores y/o especies típicas de hábitats particulares

Con demasiada frecuencia los coleópteros carábidos son citados como bioindicadores en estudios que involucran un impacto ambiental determinado. Pero si nos atenemos al significado *sensu stricto* del término “indicador”, éstos deberían ser tratados por el momento y con más propiedad como “organismos de estudio”. Conviene recordar que un *organismo de estudio* es una especie, o





bien grupo de especies de una taxocenosis determinada (parte de la comunidad que se define por su pertenencia a un grupo taxonómico), que es usada para poner a prueba una hipótesis de estudio particular dentro de un proyecto de investigación y desarrollo. En cambio, un *indicador* es un taxón –o una estructura de dominancia de un ensamble– cuyas características (por ej. presencia o ausencia, densidad poblacional, dispersión, éxito reproductivo, recambio de especies) son utilizadas como un índice para medir ciertos atributos de otras especies o de condiciones ambientales particulares de interés que sean demasiado difíciles, inconvenientes o caros de medir o estimar por otros métodos [1].

Si bien aún son necesarios más estudios para corroborar que los carábidos son buenos *bioindicadores* [1] y que por tanto el GENEBSO pueda utilizarlos como una herramienta idónea de gestión y manejo, resulta innegable por el conocimiento que tenemos de ellos que cumplen con un gran número de los requisitos indispensables para ser considerados buenos *organismos de estudio* y también buenos *bioindicadores potenciales*. Para ello cumplen estos atributos: 1) es indispensable un buen conocimiento de la taxonomía y ecología de los carábidos, que si bien está ampliamente logrado para el hemisferio norte (v.g. [1, 2]), en nuestro país la taxonomía de esta familia puede considerarse como aceptablemente buena [5]; 2) tienen una amplia distribución geográfica y habitan gran diversidad de hábitats; 3) son sensibles a factores ambientales como la temperatura, la humedad, el tamaño del parche del hábitat (aunque algunas especies pueden presentar más sensibilidad que otras a esos factores), por lo cual pueden proveer una alerta temprana de cambios en el ambiente; 4) los métodos de muestreo son económicos y fáciles de utilizar, siendo el método más comúnmente usado el de las trampas de caída o “pitfall”; 5) tienen importancia económica por ser predadores significativos de plagas agrícolas; 6) dado que hay especies que presentan fuerte estacionalidad y variaciones poblacionales año a año, es recomendable realizar muestreos que cubran toda la temporada de actividad [7]. Y es precisamente esta última premisa la que distintos integrantes del GENEBSO vienen estableciendo para la mayor cantidad de especies posible, y no solamente de carábidos sino de hemípteros y formícidos. Mientras este conocimiento se genera, también se han explorado la caracterización de potenciales especies o grupos de *especies típicas* de los ambientes de estudio desde 2003. Conviene recordar aquí que para conocer la contribución de cada especie particular a la similitud dentro de cada ambiente y, en consecuencia, evaluar la potencialidad de estas como especies típicas de cada uno de





ellos, se deben realizar análisis de porcentajes de similitud (SIMPER). Cuanto más abundante es una especie dentro de un ambiente, mayor es su contribución a las similitudes intraambiente. Una especie se considera que es típica de cierto ambiente si el número de individuos obtenido es consistente en todas las muestras recolectadas en el mismo.

Obtención de datos meteorológicos

Se ha demostrado que existe directa relación entre la abundancia de las especies (como medida de la actividad) y las variables meteorológicas [v. g. 15], y sobre todo cuando éstas se utilizan en los análisis de correspondencia canónica que involucran a las especies capturadas mediante trampas “pitfall” [16]. Por esta razón fueron rutinariamente relevadas tres variables: temperatura media (en °C), precipitación acumulada (mm) y fotoperíodo (en horas). Los datos diarios de temperatura fueron obtenidos a partir de las distintas estaciones locales dependientes del Servicio Meteorológico Nacional (SMN), las precipitaciones a partir de las mismas fuentes o bien, cuando se disponía, del pluviómetro local del propietario o administrador de los predios censados, y por último, el fotoperíodo, de la base de datos de *The Weather Channel database* (<http://espanol.weather.com/climate/sunRiseSunSet-Buenos-Aires-ARBA0009?month=12>). La totalidad de estas variables fueron obtenidas primariamente como valores diarios y luego fueron promediados acorde con los intervalos de muestreo utilizados en cada caso particular.

RESULTADOS

Sitios de colecta de los carábidos, hemípteros y formícidos censados y analizados

Incluso desde antes de su creación formal, los integrantes del GENEBSO han desarrollado campañas anuales de recolección programada y sistematizada en los siguientes sitios o localidades de particular interés para la conservación o sustentabilidad de la mitad oriental de la provincia de Buenos Aires, siendo las de mayor interés las reseñadas en la Figura 3.

Identificación de las especies colectadas, incremento del patrimonio entomológico y servicios a terceros





Referencias

- A. Reserva Integral Laguna de los Padres
- B. Reserva de Biosfera Albufera
Mar Chiquita-Laguna Nahuel Rucá
- C. Reserva del Puerto de Mar del Plata
- D. Pastizales subxéricos de Saladillo
- E. Ambientes dunales del Partido de La Costa
- F. Ambientes dunales y retrodunales
de General Pueyrredón
- G. Reserva Selva Marginal de Punta Lara
- H. Pastizales y agroecosistemas
del Partido de La Plata
- I. Franja costera del Partido de Berisso
- J. Talaes de los partidos de
Magdalena y Punta Indio
- K. Reserva Ecológica Costanera Sur
- L. Parque Municipal Forestal
y Botánico "Rafael de Aguiar"
- M. Sierras meridionales del
Partido de Balcarce
- N. Sierra de Difuntos
- O. Talaes de Mar Chiquita
y General Pueyrredón
- P. Sector de Islas de los partidos
de Campana y San Fernando
- Q. Arroyo Claromecó

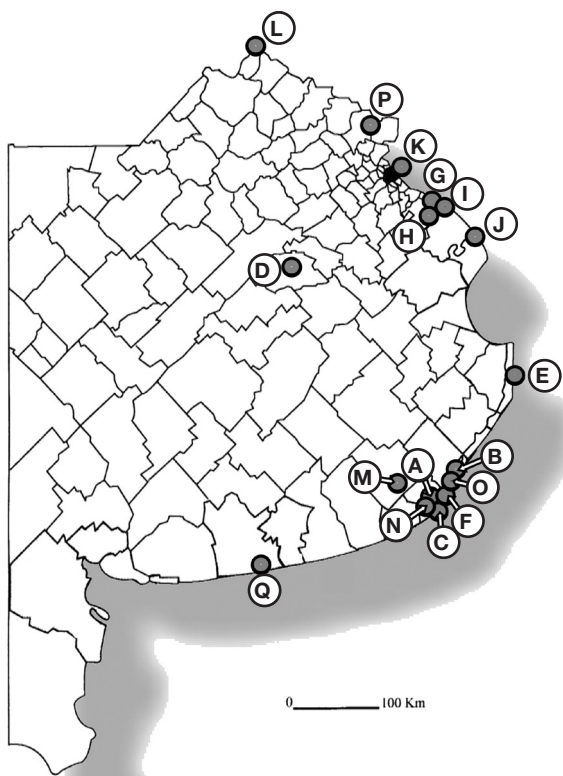


Figura 3. Situación geográfica de los principales sitios de muestreo llevados a cabo por el GENEBSO en el período 2000-2014.

Los ejemplares recolectados en los diferentes sitios de muestreo se identificaron, catalogaron y establecieron una o más taxocenosis particulares que involucran en su conjunto más de 300 especies de coleópteros carábidos y más de 500 de hemípteros, 2/3 de los cuales también se cartografiaron, obteniéndose también un importante número de fenologías locales correspondientes a distintas especies. Como resultado de estas actividades, se han publicado una gran cantidad de trabajos de investigación.





Paralelamente, el GENEBSO ha prestado servicio de identificación y suministro de información entomológica a las siguientes Instituciones y reparticiones públicas y privadas de la Argentina y del exterior: Universidad Nacional de Río Cuarto (Facultad de Ciencias Agrarias, Córdoba), Universidad Nacional de La Plata (Facultades de Agronomía y de Ciencias Naturales y Museo, La Plata, Buenos Aires), Universidad de Buenos Aires (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires), Universidad Nacional de San Martín (Departamento de Ecología, San Martín, Buenos Aires), Universidad Nacional del Sur (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Bahía Blanca, Buenos Aires), Universidad Nacional de La Pampa (Facultad de Ciencias Naturales, Santa Rosa, La Pampa), Universidad Nacional de Santiago del Estero (Facultad de Ciencias Agrarias), Universidad Nacional de Mar del Plata (Facultad de Ciencias Agrarias, Balcarce, Buenos Aires), Museo Municipal de Ciencias Naturales “Lorenzo Scaglia (Mar del Plata, Buenos Aires), Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” (CABA), Instituto Superior de Entomología e Instituto Miguel Lillo (San Miguel de Tucumán), INTA-Rafaela (Rafaela, Santa Fe), INTA-Oliveros (Oliveros, Santa Fe), INTA-Gorina (La Plata, Buenos Aires), INTA-Balcarce (Balcarce, Buenos Aires), Universidad de Concepción (Concepción y Chillán, Chile), Universidad de Chile (Santiago, Chile), Università di Sassari (Facoltà di Scienze Agrarie, Sassari, Cerdeña, Italia), Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil).

También se han realizado servicios a terceros a través del CCT-Mar del Plata consistente en la limpieza, separación e identificación de los Insectos Coleópteros de los muestreos de suelo de chacras hortícolas de los alrededores de la ciudad de Corrientes, en el marco del convenio INTA-EMBRAPA, Brasil (2011-2013), y en el asesoramiento científico y técnico, e identificación de materiales entomológicos y levantamiento, procesamiento e interpretación de los datos obtenidos en el marco del proyecto “Estudio de la agrobiodiversidad en sistemas de producción hortícola familiar del cinturón hortícola platense” coordinado por la Dra. Mariana Marasas, INTA-IPAF región pampeana (2012-2013).

Todas estas actividades de muestreo, identificación y servicios a terceros han aportado importantes cantidades de materiales entomológicos, los cuales incluyen especies no descritas, otras poco frecuentes o conocidas casi exclusivamente a través de sus descripciones originales, así también como nuevas especies que están siendo descritas y dadas a conocer en revistas especializadas, totalizando más de 350 especies de carábidos por la provincia de Buenos Aires





(y más de 800 para la Argentina), a la par que unas 900 especies de hemípteros y un número aún indeterminado pero creciente de formícidos.

CONCLUSIONES

Rol del GENEBSO en la conservación de la biodiversidad de sitios protegidos o susceptibles de protección

La distribución temporal de las especies investigadas a nivel local y zonal se constituye en un factor clave a tomar en cuenta en el manejo y gestión de sitios protegidos o bien de agroecosistemas, debido a que tiene muy en cuenta el período de reproducción de las distintas especies que integran las taxocenosis de los mismos y, en consecuencia, asegurar su supervivencia. En el caso particular de los agroecosistemas, aquellas especies que se reproducen durante el o los períodos en que se desarrollan prácticas intensivas de laboreo son las más afectadas y por ende las más necesitadas de un replanteo o redimensionamiento temporal de las mismas [7, 17]. Asimismo, aquellas especies cuyos picos de actividad tienen lugar en la primavera temprana frecuentemente son también afectadas por el uso de pesticidas dado que su período de actividad coincide con el momento de aplicación, razón por la cual surge la necesidad de reducir al mínimo el lapso temporal de su aplicación. El conocimiento de la fenología de las distintas especies que integran los ensambles a nivel de escala local y zonal es de gran importancia, ya que obliga a tomar en consideración cuál época del año sería la más adecuada para realizar monitoreos o seguimientos de la biodiversidad cualquier tipo, debido a que hay grupos de especies que muestran su principal período de actividad en distintas estaciones del año. A su vez, nuestros muestreos llevados a cabo entre los paralelos 35° y 39° LS de la mitad oriental de la provincia de Buenos Aires (ver más arriba) parecen indicar que la mayor parte de las *especies típicas* de hábitats o ambientes particulares tienen su pico de actividad en primavera tardía o verano, y por lo tanto con la potencialidad de aportar más información acerca de las características de estos hábitats o ambientes que en otoño o invierno. No obstante, estos mismos muestreos nos han indicado que en más de un caso las especies que no se han considerado como típicas de hábitats o ambientes específicos, también pueden aportar datos adicionales acerca del estado sucesional de los mismos, contribuyendo entonces al incremento de la información para su mejor manejo y gestión.





Otra lección aprendida está referida a la conservación de los ambientes seminaturales o naturaliformes, la cual tiene su correlato en la conservación de comunidades estables de estos insectos, mayormente debido a la heterogeneidad estructural y diversidad de microhábitats con condiciones específicas que éstos ofrecen y que son complementarios de los hábitats esencialmente monótonos de las áreas cultivadas. Por eso, para mantener la diversidad en la fauna de estos y otros artrópodos característicos de un tipo de hábitat, los parches a ser preservados deberían poseer la mayor extensión posible, mantener activas el mayor número vías de conectividad, teniendo la especial precaución de no homogenizar el paisaje.

Finalmente, ha quedado claro para todos los integrantes del GENEBSO que los patrones de distribución observados en los carábidos, hemípteros y formícidos reflejan casi linealmente los cambios ambientales causados directa o indirectamente por las actividades antrópicas, incluso a niveles de micro y aun nanoescala [17]. No obstante, a estos últimos niveles de escala debe prestarse especial atención al tipo de información que se evalúa como herramienta de seguimiento o gestión, ya que guarismos tales como la riqueza específica *per se* puede ser una medida poco conducente para tales fines, debiendo ser complementada entonces con la funcionalidad (especialmente en términos de preferencias de hábitat y su uso) de las especies particulares allí presentes [1].

Como corolario surge que cuanto mayor es la diversidad de insectos -y eventualmente también arácnidos- en los agroecosistemas y áreas protegidas o por proteger, y cuanto más tiempo éstas permanecen libres de disturbio, mayores son las interrelaciones que tienen lugar para promover la estabilidad de tales comunidades. En definitiva, este criterio biocenológico y dinámico de la biodiversidad, tarea central de los proyectos de investigación que ha venido desarrollando el GENEBSO desde su creación, no es más que la faceta entomológica visible de la tan ansiada sustentabilidad de estos sistemas biológicos en una era de creciente dominio humano sobre la casi totalidad de los ecosistemas del planeta [3].





REFERENCIAS

1. Koivula MJ (2011) Useful model organisms, indicators, or both? Ground beetles (Coleoptera, Carabidae) reflecting environmental conditions. *ZooKeys* 100:287–317.
2. Kotze DJ, Brandmayr P, Casale A, Dauffy-Richard E, Dekoninck W, Koivula MJ, Lövei GL, Mossakowski D, Noordijk J, Paarmann W, Pizzolotto R, Saska P, Schwerk A, Serrano J, Szyszko J, Taboada A, Turin H, Venn S, Vermeulen R, Zetto T (2011) Forty years of carabid beetle research in Europe: from taxonomy, biology, ecology and population studies to bioindication, habitat assessment and conservation. *ZooKeys* 100:55–148.
3. Lövei GL (2008) Ecology and conservation biology of ground beetles (Coleoptera: Carabidae) in an age of increasing human dominance. 145 p. <http://real-d.mtak.hu/121/1/Lovei.pdf> (accedido 3–XI-2014).
4. Lövei GL, Sunderland KD (1996) The ecology and behavior of ground beetles (Coleoptera: Carabidae). *Ann Rev Entomol* 41:241–256.
5. Roig-Juñent S (1998) Carabidae. En: JJ Morrone y S Coscarón (eds.), Biodiversidad de Artrópodos Argentinos. Una perspectiva biotaxonómica, Ediciones Sur, La Plata, pp. 194–209.
6. Penev L (1996) Large-scale variation in carabid assemblages, with special reference to the local fauna concept. *Ann Zool Fennici* 33:49–63.
7. Rainio J, Niemelä J (2003) Ground beetles (Coleoptera: Carabidae) as bioindicators. *Biodiv Cons* 12:487–506.
8. Porrini DP, Castro AV, Cicchino AC (2014) Los carábidos (Coleoptera: Carabidae) asociados a los remanentes del bosque nativo de la Reserva Natural Municipal Laguna de los Padres, Buenos Aires. *Revta Soc Entomol Arg* 73(1-2):35–48.
9. Gerlach A, Voigtländer K, Heidger CM (2009) Influences of the behaviour of epigeic arthropods (Diplopoda, Chilopoda, Carabidae) on the efficiency of pitfall trapping. *Soil Organisms* 81(3):773–790.
10. Adis J (2002) Recommended sampling techniques. En: Adis J (ed.), Amazonian Arachnida and Myriapoda, PENSOFT Publishers, Moscú, pp. 555–576.
11. Fazekas J, Kádár F, Sárospataki M, Lövei G (1997) Seasonal activity, age structure and egg production of the ground beetle *Anisodactylus signatus* (Coleoptera: Carabidae) in Hungary. *Europ J Entomol* 94:473–484.
12. Spence JR, Niemelä J (1994) Sampling carabid assemblages with pitfall traps: the madness and the method. *Can Entomol* 126(3):88–894.





13. Danks HV (1987) Insect dormancy: an ecological perspective. Biological Survey of Canada Monographs Series 1, 433 p, Ottawa.
14. Venn SJ, Kotze DJ, Niemelä J (2003) Urbanization effects on carabid diversity in boreal forests. *Eur J Entomol* 100:73-80.
15. terBraak CJF (1986) Canonical Correspondence Analysis: A new Eigenvector Technique for Multivariate Direct Gradient Analysis. *Ecology* 67(5):1167-1179.
16. Palmer MW (1993) Putting things in even better order: The advantages of canonical correspondence analysis. *Ecology* 74 (8):2215-2230.
17. Cicchino AC (2003) La carabidofauna edáfica de los espacios verdes del ejido urbano y suburbano marplatense. Su importancia como herramienta de manejo de estos espacios. *Revista de Ciencia y Tecnología, UNSE* 8:145-164.





4:

BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL







CAPÍTULO 11

Las floraciones de cianobacterias toxígenas y su impacto en la calidad del agua para consumo y recreación

María de los Ángeles Kolman, Anabella Aguilera,
María Victoria Martín, Graciela L. Salerno

Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología – Consejo Nacional
de Investigaciones Científicas y Técnicas (INBIOTEC-CONICET), y Fundación
para Investigaciones Biológicas Aplicadas, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
gsalerno@fiba.org.ar

RESUMEN

Las cianobacterias (conocidas también como algas verde-azuladas) son microorganismos que realizan fotosíntesis con liberación de oxígeno al igual que las plantas. Se las puede encontrar en una amplia diversidad de hábitats. Bajo determinadas condiciones ambientales, generalmente vinculadas a un aumento de la temperatura y una baja relación entre nitratos y fosfatos, ciertas especies de cianobacterias pueden aumentar su biomasa en forma exponencial, fenómeno que se conoce como “floración” o “bloom”. En el presente, es cada vez más frecuente que se produzcan estas proliferaciones masivas como consecuencia del enriquecimiento de aguas con nutrientes generados por contaminaciones derivadas de actividades humanas que producen degradación ambiental (eutrofización). La mayoría de estas floraciones son nocivas porque intervienen cianobacterias que liberan peligrosas toxinas (hepatotóxicas, neurotóxicas, dermatotóxicas) las cuales pueden ocasionar serios problemas sanitarios. Por lo tanto, para asegurar la calidad de los recursos hídricos destinados al consumo





humano o animal, o para recreación, es necesario poder identificar las especies de cianobacterias presentes en cuerpos de agua de interés y su capacidad potencial de producir toxinas.

Desde hace una década, nuestro laboratorio comenzó un proyecto para formar recursos humanos que pudieran aportar diferentes herramientas bioquímico-moleculares para complementar estudios de taxonomía tradicional. Las nuevas metodologías permiten la detección precoz de cianobacterias toxígenas y de la potencialidad de sintetizar toxinas en las especies presentes en una floración. En una primera etapa se pusieron a punto técnicas para la caracterización molecular de cianobacterias nativas presentes en cuerpos de agua de la Cuenca del Plata, y se logró la primera caracterización molecular de una cepa de género *Microcystis* en la región. Posteriormente, se iniciaron estudios en cepas de cianobacterias modelo para investigar respuestas metabólicas a condiciones ambientales de la floración con el fin de adquirir el conocimiento necesario para evaluar con alta sensibilidad y tempranamente la magnitud de episodios de floraciones y prever su impacto sanitario y ambiental.

Nuestro grupo de trabajo, pionero en América Latina en estudiar la biología funcional de cianobacterias, se ha focalizado también en hacer aportes a la problemática de las floraciones tóxicas, a través de la organización de talleres iberoamericanos, de los cuales surgió el Grupo de Trabajo sobre Cianobacterias creado por el Ministerio de Salud de la Nación (Disposición SS 2/2011), del cual forma parte.





INTRODUCCIÓN

La degradación de la calidad de los recursos hídricos destinados al consumo humano representa una de las problemáticas que más atención ha generado en los últimos años. El crecimiento poblacional por un lado trae aparejado un aumento en la demanda de este recurso y por otro, un incremento en el desarrollo de actividades que interfieren con la estabilidad de los sistemas acuáticos. El incremento del número de centros urbanos, así como de las actividades industriales y agrícola-ganaderas, trae aparejado un aumento en el vertido de desechos ricos en nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo, los cuales contribuyen a la alteración del estado trófico de los cuerpos de agua, fenómeno que se conoce como eutrofización antrópica.

En Argentina, producto de las prácticas agrícolas no conservacionistas y de las actividades industriales no reguladas, la sostenibilidad de las fuentes de agua superficiales se encuentra en riesgo. Ejemplos de esto son la contaminación con aguas servidas sin tratar y residuos cloacales en embalses localizados en Córdoba, Bahía Blanca y Santiago del Estero, y el aporte de residuos industriales en el cordón industrial de los ríos Paraná y de la Plata, en la cuenca Matanza-Riachuelo y en el río Reconquista [1].

La eutrofización de los sistemas acuáticos sumada al incremento de las temperaturas producto del calentamiento global, ocasionan cambios importantes en las comunidades biológicas, favoreciendo el aumento masivo de grupos de organismos competitivamente exitosos en estas condiciones [2]. Esto se ha evidenciado en las últimas décadas con la aparición de floraciones de cianobacterias (microorganismos fotosintéticos), también conocidas como algas verde-azules, de manera cada vez más frecuente y más extendida geográficamente.

Si bien las cianobacterias se distribuyen ampliamente tanto en sistemas acuáticos como terrestres, habitan especialmente ambientes de agua dulce, y su presencia puede ocasionar serios inconvenientes en las actividades humanas y en la salud de la población. Pero no sólo la presencia de cianobacterias afecta negativamente la estética de un cuerpo de agua por la acumulación de “espuma verde” y por la generación de olores desagradables (provenientes de la producción de compuestos como la geosmina y metilisoborneol), sino también, y mucho más importante, es que muchas cepas son capaces de producir toxinas (cianotoxinas) que afectan severamente la salud humana y animal [3].





EFFECTO SOBRE LA SALUD HUMANA	TOXINA	GÉNEROS PRODUCTORES
Hepatotoxinas	Microcistina	<i>Microcystis</i>
		<i>Anabaena</i>
		<i>Anabaenopsis</i>
		<i>Planktothrix</i>
	Nodularina	<i>Nodularia</i>
Neurotoxinas	Anatoxina	<i>Cylindrospermopsis</i>
		<i>Aphanizomenon</i>
		<i>Raphidiopsis</i>
		<i>Anabaena</i>
	Saxitoxinas	<i>Oscillatoria</i>
		<i>Aphanizomenon</i>
Dermotoxinas	Lyngbyatoxina	<i>Raphidiopsis</i>
		<i>Anabaena</i>
	Aplasiatoxinas	<i>Cylindrospermopsis</i>
		<i>Planktothrix</i>
Dermotoxinas	Lyngbyatoxina	<i>Lyngbya</i>
		<i>Oscillatoria</i>
	Aplasiatoxinas	<i>Lyngbya</i>
		<i>Oscillatoria</i>

Tabla 1. Clasificación de las cianotoxinas. Metabolitos tóxicos sintetizados por cepas pertenecientes a distintos géneros de cianobacterias.

Las **cianotoxinas** son compuestos químicamente diversos (péptidos cíclicos o alcaloides) que se agrupan según su modo de acción en hepatotoxinas, neurotoxinas y dermatotoxinas [3] (Tabla 1) y pueden ser sintetizadas por cepas pertenecientes a varios géneros, entre ellos *Microcystis*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Raphidiopsis*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Nodularia*, *Umezakia* y *Fischerella* [4]. Las **hepatotoxinas**, y en particular las microcistinas son las responsables de la mayor parte de los casos de intoxicación





por cianotoxinas en el mundo. Pueden producir intoxicaciones agudas, con vómitos, diarrea y debilidad, con disrupción masiva de la arquitectura lobular y sinusoidal del hígado y hemorragia intrahepática [5]. Recientemente se ha logrado establecer una relación entre la exposición crónica a concentraciones bajas de microcistinas y el aumento de la incidencia de cáncer de hígado [5]. Por otra parte, las **neurotoxinas** causan parálisis por sobre-estimulación muscular con la consecuente caída de la presión arterial por vasodilatación periférica e interrupción de la actividad diafragmática con el consecuente paro respiratorio [5].

En la Argentina se han reportado **floraciones cianobacterianas** a lo largo de todo el territorio, tanto en aguas recreacionales como en las destinadas al consumo humano, habiéndose detectado en varios casos la presencia de géneros potencialmente tóxicos como *Microcystis*, *Dolichospermum* (también denominada *Anabaena*), *Cylindrospermopsis* y *Raphidiopsis*, y en algunos casos se ha reportado la presencia de cianotoxinas, especialmente microcistinas [6]. Si bien el primer caso de intoxicación en vertebrados se registró en 1944 [7], en 2007 se reportó la primera intoxicación aguda en humanos causada por microcistinas por exposición accidental a una floración tóxica en el Embalse Salto Grande (Entre Ríos) [8]. La problemática de las floraciones cianobacterianas es considerada de importancia sanitaria por el Ministerio de Salud, con el que nuestro laboratorio ha colaborado de manera activa para la constitución del “Grupo de Trabajo sobre Cianobacterias” (Disposición N°2/2011) para la difusión y concientización de la problemática en las zonas sanitarias del país más afectadas y para el desarrollo de estrategias para prevención, para armonizar un registro de casos de pacientes expuestos a las toxinas, y para posteriores estudios epidemiológicos.

Es importante destacar que la detección temprana de la presencia de cianobacterias y de su potencial tóxico en un cuerpo de agua es esencial para establecer un sistema de alerta que permita asegurar la calidad del recurso destinado al consumo humano o animal, o para recreación. Para ello, se han implementado técnicas que incluyen tanto la identificación de cianobacterias mediante claves taxonómicas y técnicas moleculares.

Para la **identificación de cianobacterias** se han comenzado a utilizar técnicas de la microbiología general y metodologías de la biología molecular (Fig. 1). Por un lado, se utilizan claves taxonómicas para determinar los géneros de cianobacterias presentes en una muestra ambiental y se establece el poten-



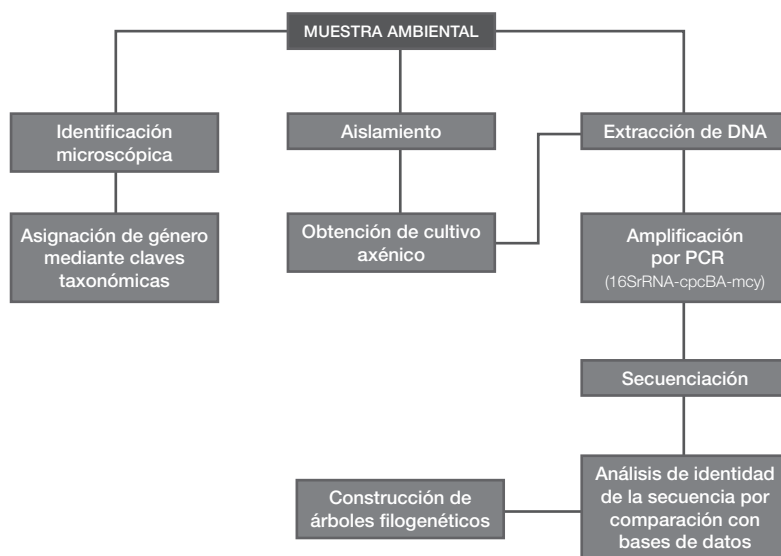


Figura 1. Diagrama de flujo del procedimiento, paso a paso, para la identificación de cianobacterias presentes en una muestra ambiental.

cial toxigénico mediante una simple asociación con el género identificado. El uso de microscopía óptica no sólo aporta información importante en cuanto a la identificación morfológica de los organismos presentes en la floración, sino que también permite el recuento celular y el monitoreo del cuerpo de agua. Esta metodología es ampliamente utilizada por su bajo costo y por su implementación relativamente simple. Sin embargo, se requiere entrenamiento para el uso de claves taxonómicas y una vez identificado el género no se puede determinar si tiene la capacidad para producir toxinas, ya que dentro de un mismo género puede haber cepas toxígenas y otras que no lo son.

En la actualidad, el uso de **metodologías basadas en la biología molecular** permite complementar los resultados de identificación por métodos de la taxonomía clásica. El aislamiento de cepas del ambiente, la generación de bancos de cepas, su caracterización morfológica y el conocimiento de secuen-





cias de genomas completos, constituyeron la base para el desarrollo de estas metodologías, que pueden ser usadas tanto para identificación molecular como para detectar cepas potencialmente tóxicas. Con la información que aportó la obtención de secuencias específicas de genes claves, se pusieron a punto métodos de amplificación de fragmentos de DNA de interés a partir de muestras aisladas del ambiente. Estos métodos, además de ser altamente específicos, ofrecen la ventaja adicional de poder detectar cepas que estén aún en muy baja concentración (altamente sensibles), pero que si proliferaran masivamente podrían llegar a producir una cianotoxina, de alto riesgo para la población. Por lo tanto, el diagnóstico molecular constituye un poderoso complemento de las técnicas microscópicas que adiciona la identificación precoz de cepas tóxicas presentes en los cuerpos de agua.

APORTES DE NUESTRO GRUPO DE INVESTIGACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN Y MONITOREO DE CIANOBACTERIAS

Para realizar la identificación molecular de los microorganismos presentes en un cuerpo de agua se comienza con la extracción del DNA total de la muestra ambiental filtrada y conservada adecuadamente. El DNA es utilizado como molde para la amplificación de una secuencia de interés por la metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y utilizando cebadores universales. Las primeras identificaciones moleculares de cianobacterias se basaron en la amplificación de la secuencia codificante del gen ribosomal 16S (*RNAr 16S*) completo o parcial y de la secuencia nucleotídica de la región intergénica entre los genes *RNAr 16S* y *RNAr 23S* (denominada *RNAr-ITS*) [9]. Dado que uno de los principales inconvenientes al utilizar estas secuencias reside en el hecho de que en una muestra ambiental también se encuentra una elevada cantidad de otros organismos, se propuso la amplificación de una secuencia específica y característica de las cianobacterias que corresponde al operón *cpc* responsable de la síntesis de la ficocianina (PC), pigmento accesorio presente sólo en el aparato fotosintético de las cianobacterias [9].

La posibilidad de contar con la secuencia completa del operón *mcy* que codifica las enzimas involucradas en la síntesis de microcistinas en *M. aeruginosa* PCC 7806 [10] permitió el desarrollo de cebadores específicos para secuencias nucleotídicas claves en la síntesis de dichas toxinas. Estos marcadores de toxicidad pueden ser utilizados para el análisis de muestras de DNA ambiental,





permitiendo conocer si están presentes cepas con potencialidad para producir toxinas. La principal ventaja del uso de técnicas moleculares para determinar la potencial toxicidad de las cianobacterias presentes en una muestra reside en su sensibilidad, siendo posible detectar la presencia de estos genes en muestras con muy baja densidad celular.

Desde hace más de 10 años, nuestro grupo de trabajo ha venido desarrollando trabajos enfocados a la identificación, caracterización molecular y comprensión de los factores ambientales que influyen sobre el desarrollo de floraciones. En los primeros trabajos, en colaboración con el Dr. Ricardo Echenique de la Universidad Nacional de La Plata -Museo-CIC-Prov. de Buenos Aires, se llevaron a cabo monitoreos periódicos en el Río de La Plata, específicamente colectadas en la zona de Ensenada y en las cercanías de la toma de agua de la planta potabilizadora que abastece el consumo público de las ciudades de La Plata, Berisso y Ensenada (Fig. 2 A). Para realizar la identificación molecular de los microorganismos en estas muestras se estandarizaron protocolos de extracción de DNA de cianobacterias a partir de muestras ambientales, así como también de protocolos para la amplificación de los genes *RNAr 16S* y *cpbA* que permitieron la identificación molecular. De esta manera, se logró establecer que durante los años 2005-2008 la especie predominante en esta región fue *M. aeruginosa*. Los análisis moleculares complementarios permitieron detectar la presencia del gen *mcyA*, relacionado con la síntesis de microcistinas, indicando su potencial tóxico. Asimismo, durante este período se aislaron dos cepas nativas de muestras de cuerpos de agua de la provincia de Buenos Aires (Fig. 2 B) utilizando métodos de la microbiología clásica. Ambas cepas se encuentran en estado axénico y fueron caracterizadas tanto a nivel morfológico como molecular. Asimismo, se determinó que una de ellas produce un tipo de microcistina que sería característica de nuestra región [11].

Por otra parte, se realizaron muestreos periódicos en la laguna Los Patos, un cuerpo de agua hipereutrófico localizado en el partido de Ensenada, Provincia de Buenos Aires, Argentina (Fig. 2 C). A partir de estas muestras, se identificaron 18 taxa pertenecientes a 12 géneros. Entre ellos, 8 han sido citados como productores de toxinas. De los organismos observados, se destaca la presencia en altas densidades de especies productoras de hepatotoxinas (*M. aeruginosa*, *Planktothrix agardhii*, *Raphidiopsis mediterranea*) y neurotoxinas (*R. mediterranea*, *P. agardhii* y cepas de *Oscillatoria*). A fin de estimar la dinámica poblacional de las especies potencialmente toxígenas, se realizó un muestro quincenal por



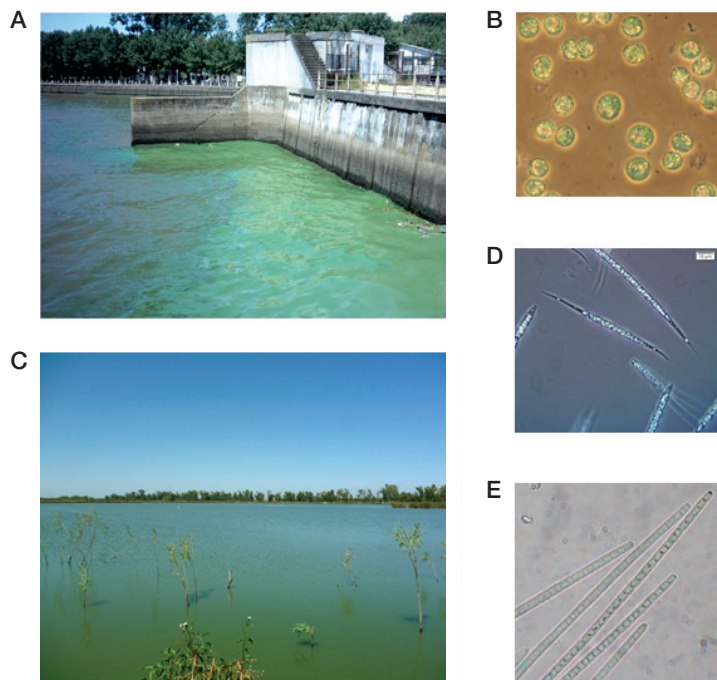


Figura 2. Cianobacterias formadoras de floraciones de la Provincia de Buenos Aires.

A) Toma de agua de la planta potabilizadora de la ciudad de La Plata. Foto gentilmente cedida por el Dr. Ricardo Echenique. B) Cepa de *Microcystis aeruginosa*, aislada en la localidad de Pila, Provincia de Buenos Aires. C) Laguna Los Patos, cuerpo de agua hipereutrófico localizado en la ciudad de Ensenada. D y E) Cepas, aisladas de la laguna Los Patos: D) *Raphidiopsis mediterranea* y E) *Planktothrix agardhii*.

un periodo de dos años en la mencionada laguna. Durante todo el período de estudio se registraron floraciones de cianobacterias, siendo *P. agardhii* y *R. mediterranea* las especies que protagonizaron las floraciones más significativas. A partir de muestras ambientales recolectadas en esta laguna, se aislaron cepas nativas de estas dos especies, las cuales fueron caracterizadas morfológica y molecularmente, y forman parte de la colección de cultivos del laboratorio FIBA-





INBIOTEC (Fig. 2 D y E). Mediante metodología basada en la PCR y con el uso de cebadores específicos, se detectó la presencia del gen *mcyE* relacionado con la producción de microcistinas en la cepa nativa de *P. agardhii*.

Con el fin de determinar los factores ambientales que promueven el desarrollo de floraciones y la dominancia de estas dos especies, se realizaron estudios ecofisiológicos bajo condiciones controladas de laboratorio. Se investigó la respuesta de ambas cepas creciendo en co-cultivo ante una serie de condiciones lumínicas y nutricionales. Los resultados obtenidos confirmaron que ambas especies tienen preferencias ambientales diferentes y que los factores luz y nutrientes (relación fósforo/nitrógeno) son clave para la dominancia de cada una de ellas.

Estudios recientes indican que las toxinas (en particular las microcistinas) podrían estabilizar la estructura de los carboxisomas [12], que son estructuras que potencian la capacidad fotosintética y de supervivencia bajo condiciones limitantes de CO₂. Es decir, aunque aún es un tema de debate, en adición a su toxicidad indiscutible, las cianotoxinas podrían cumplir funciones en el desarrollo de las cianobacterias, como la defensa a patógenos, la comunicación célula a célula y la estabilización de estructuras necesarias para la adaptación al ambiente [12, 13]. Recientemente, nuestro laboratorio ha comenzado a estudiar los mecanismos de concentración de carbono (CCM) en cepas cianobacterianas toxígenas formadoras de floraciones de interés regional, con el objetivo de contribuir al estudio de mecanismos adaptativos mediados por las toxinas para el desarrollo de metodologías y tecnologías para la remediación de aguas contaminadas. Se espera que estos estudios bioquímico-moleculares contribuyan a identificar las bases para el desarrollo de herramientas que permitan la detección precoz y/o la prevención de floraciones.

Nuestro grupo ha realizado numerosas actividades de difusión de la problemática de las floraciones. Con el objetivo de crear un ámbito donde se reunieran especialistas de las distintas áreas del conocimiento relacionadas con la problemática de las floraciones cianobacterianas provenientes de distintos lugares de Argentina y de otros países (del Mercosur (Uruguay, Paraguay y Brasil), Colombia y España), la Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), con el apoyo de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Ministerio de Ciencia, Técnica e Innovación Productiva, MINCyT, Argentina), del CONICET y de empresas relacionadas con la provisión de agua potable, ha organizado 5 Talleres de la Red CyanoSur durante





el período 2004 – 2012. El V Taller se realizó en 2012, en forma conjunta con el Ministerio de Salud de la Nación. En estos encuentros se discutieron los temas más relevantes vinculados a aspectos medioambientales, biológicos, toxicológicos, epidemiológicos, educativos y comunicacionales para evaluar la situación actual en la Argentina y hacer un relevamiento de las necesidades a nivel nacional. A partir del trabajo realizado en estos talleres se fijaron pautas de trabajo conjunto para organizar los laboratorios en redes para realizar análisis y detección de cianotoxinas con diferentes complejidades analíticas, y con laboratorios regionales de referencia. Además, se promovió la implementación de planes de monitoreo y vigilancia, identificando las poblaciones en riesgo para lo que se estableció el Grupo de Trabajo para la formación de agentes sanitarios en lugares donde no existan expertos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Son numerosos los reportes de floraciones cianobacterianas en nuestro país en los últimos años y algunos de ellos han alcanzado los medios de comunicación masiva generando preocupación en la población. Tal es así que esta problemática ha sido tenida en cuenta en la redacción del Plan Estratégico Argentina Innovadora 2020 dentro del Núcleo Socio-Productivo Estratégico: Recursos Hídricos. A nivel mundial, existe un consenso general en la comunidad científica de que como consecuencia del calentamiento global, este tipo de fenómeno está en aumento, por lo que la caracterización rápida y apropiada de los organismos presentes en una floración debería ser rápida y eficaz, para establecer un sistema de alerta para la prevención de los problemas sanitarios asociados. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la identificación de las cianobacterias se realiza mediante técnicas de microscopía que requieren personal técnico altamente capacitado, siendo esto último un factor limitante ya que en muchos casos esta tarea es llevada a cabo por personal inexperto, además de que no ofrece información acerca de la potencialidad para producir compuestos tóxicos. Las técnicas moleculares ofrecen una alternativa práctica, ya que sólo requieren un entrenamiento básico en la aplicación de protocolos estándar.

Además, se han detectado falencias importantes que aún no se han solucionado. La primera es no contar con un Centro de Referencias de Cianobacterias toxígenas y toxinas a nivel nacional, al cual pueda acudir para estandarizar





metodologías, realizar análisis de alta complejidad con equipamientos de alto costo (HPLC, HPLC-MS, NMR), depositar cepas nativas, producir toxinas locales para estándares analíticos, entre otras. Otra necesidad importante es lograr desarrollar algún método analítico de fácil implementación, alta sensibilidad y bajo costo para ser usado en las plantas potabilizadoras, en aguas de recreación, etc., que permita tomar decisiones rápidas y certeras.

OFERTA TECNOLÓGICA

En nuestro laboratorio contamos con las herramientas necesarias, y el personal entrenado para realizar tanto la identificación de cianobacterias, la determinación de la potencial toxicidad, y el aislamiento y mantenimiento de cultivos de cianobacterias a escala piloto. Además, disponemos del equipamiento necesario para realizar experimentos a nivel ecofisiológico, genético y bioquímico que aporten información referida a la comprensión del fenómeno de las floraciones cianobacterianas, lo que resulta de gran utilidad para las prácticas de manejo de cuerpos de agua destinados tanto a la recreación como al abastecimiento de agua potable. Por otro lado, es un importante objetivo de nuestro grupo poder aportar técnicas analíticas para detección precoz y capacitar recursos humanos, ya sea para su inserción en el ámbito privado como en organismos gubernamentales a nivel municipal, provincial o nacional. Una de nuestras metas próximas es el desarrollo de un kit diagnóstico para la detección de cianotoxinas, para lo cual es necesario impulsar la producción de patrones de toxinas purificadas de cepas nativas. Esto dependerá en gran medida del desarrollo de proyectos en colaboración con otras instituciones y laboratorios públicos y privados.





REFERENCIAS

1. Porchat V (2012) *RECURSOS HÍDRICOS*, (Ministerio de Ciencia TeIP).
2. Paerl HW, Huisman J (2009) Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environ Microbiol Rep* 1(1):27-37.
3. Codd GA, Lindsay J, Young FM, Morrison LF, Metcalf JS (2005) Harmful cyanobacteria. From mass mortalities to management measures. *Harmful cyanobacteria*, Aquatic Ecology, eds Huisman J, Matthijs HCP, Visser PM (Springer, Netherlands.), Vol 3.
4. Carmichael W (2008) A world overview — One-hundred-twenty-seven years of research on toxic cyanobacteria — Where do we go from here? *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*, Advances in Experimental Medicine and Biology, ed. Hudnell HK (Springer The Netherlands), Vol. 619, pp 105-125.
5. Metcalf JS, Codd GA (2012) Cyanotoxins. *Ecology of Cyanobacteria II*, ed. Whitton BA (Springer, The Netherlands), pp 651-675.
6. Echenique R, Aguilera A, Giannuzzi L (2014) Problems on drinking water related to toxigenic Cyanobacteria: some cases studied in Argentina. *Adv Limnol* 65:431-444.
7. Mullor JB (1945) Algas tóxicas. *Revista del colegio de doctores en bioquímica y farmacia* 1:66-76.
8. Giannuzzi L, Sedan D, Echenique R, & Andrinolo D (2011) An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. *Marine Drugs* 9(11):2164-2175.
9. Pearson LA, Neilan BA (2008) The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Curr Op Biotech* 19(3):281-288.
10. Tillett D, et al. (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem & Biol* 7(10):753-764.
11. Rosso L, et al. (2014) *Microcystis aeruginosa* strain [D-Leu¹] Mcyst-LR producer, from Buenos Aires province, Argentina. *J Coastal Life Med* 2(4):287-296.
12. Zilliges Y, et al. (2011) The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of microcystis under oxidative stress conditions. *PLoS One* 6(3):e17615.





13. Alexova R, Haynes PA, Ferrari BC, Neilan BA (2011) Comparative protein expression in different strains of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Mol Cel Proteomics* 10(9):M110.003749-M003110.003749.





CAPÍTULO 12

Uso de técnicas moleculares para el estudio de la biodiversidad de las fracciones más pequeñas del fitoplancton del Mar Argentino

Macarena Perez-Cenci, Gonzalo F. Caló,
Dana Scheidegger, Graciela L. Salerno

Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (INBIOTEC-CONICET), y Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
gsalerno@fiba.org.ar

RESUMEN

Actualmente estamos frente a un cambio climático global, atribuido directa o indirectamente a las actividades humanas, y una de sus consecuencias es el aumento de la temperatura a escala planetaria causada por el incremento de la concentración atmosférica de gases del efecto invernadero, como el dióxido de carbono. Aproximadamente una cuarta parte de este gas es atrapado por los mares y océanos, que cubren cerca del 71% de la superficie de la tierra, a través de la actividad de los organismos del fitoplancton marino, responsables de la mitad de la fotosíntesis del planeta. Dentro del fitoplancton, las fracciones más pequeñas (pico y nanofitoplancton) constituyen una comunidad diversa que domina la biomasa de las zonas centrales de los océanos y la productividad primaria de la biosfera. En los próximos años se estima que el cambio climático altere la composición de dichas comunidades, por





lo cual hay un creciente interés a nivel mundial en conocer exacta y rápidamente las distintas especies de relevancia que la componen y sus variaciones espaciales y temporales.

En el hemisferio norte, en los últimos años se han logrado importantes avances en la identificación de los organismos del pico-nanoplancton marino, así como en el conocimiento de su dinámica poblacional. Dado el extremadamente pequeño tamaño de estos organismos, la implementación de metodologías moleculares y otras técnicas modernas, ha sido clave para estos avances científicos. Nuestro grupo de trabajo ha sido pionero en poner a punto y aplicar estas metodologías para generar los primeros datos moleculares que aportan al conocimiento de la diversidad de picocianobacterias y de especies pico-nanofitoplanctónicas eucariotas presentes en el océano Atlántico Sudoccidental, y en particular en el Mar Argentino.

INTRODUCCIÓN

La actividad humana afecta el clima de nuestro planeta al generar emisiones de gases del efecto invernadero a la atmósfera, como el dióxido de carbono (CO_2), provocando un calentamiento de la superficie de la Tierra y una distorsión en el sistema climático global [1]. Aproximadamente una cuarta parte del CO_2 emitido por las actividades humanas es absorbido anualmente por los océanos [2]. Los organismos fotosintéticos integrantes del plancton marino (fitoplancton), tienen una función clave como bomba biológica (“biological pump”) ya que fijan el CO_2 a través de la fotosíntesis, capturando carbono y transfiriéndolo a las capas profundas del océano. Estos organismos son esenciales para la sostenibilidad de la cadena trófica y son reconocidos como responsables de la mitad del total de la producción primaria en los océanos y, junto con las algas, como generadores de la mitad de las moléculas de oxígeno de la atmósfera [3].

El picofitoplancton se define como el conjunto de células que pasan a través de un filtro de 3 μm , y el nanofitoplancton como aquellas que poseen un tamaño menor a 20 μm . El conocimiento de los organismos que dominan el fitoplancton es muy escaso debido a sus tamaños, a pesar de que son mucho más abundantes que los integrantes del microfitoplancton (> 20 μm). Los rasgos distintivos de la mayoría de las especies más pequeñas sólo pueden visualizarse mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido,





que además de demandar excesivo tiempo de procesamiento y una cantidad apreciable de material biológico, ofrece resultados limitados en cuanto a la diversidad ambiental global. Los estudios llevados a cabo en el océano Pacífico Norte y en el mar Mediterráneo en las últimas dos décadas indicaron que el picofitoplancton domina la biomasa fotosintética de las zonas centrales de los océanos (60–80%) y la productividad primaria de la biosfera [4]. Esta fracción del plancton está compuesta por: i) picocianobacterias, procariontes que llevan a cabo fotosíntesis oxigénica, representadas principalmente por los géneros *Synechococcus* y *Prochlorococcus*, y ii) algas pico y nanoeucariotas de una amplia diversidad taxonómica, aún poco conocidas. A partir de estudios realizados en el hemisferio norte combinando técnicas tradicionales, como la microscopía de fluorescencia, con nuevas metodologías, como la citometría de flujo y las derivadas de la biología molecular, surge la posibilidad de descubrir la existencia de nuevos taxones [5]. Con estos métodos, se han descrito numerosas especies de eucariotes picoplanctónicos fotosintéticos, pertenecientes al menos a nueve clases de algas (Chlorophyceae, Eustigmatophyceae, Trebouxiophyceae, Prymnesiophyceae, Bolidophyceae, Eustigmatophyceae, Pinguiphyceae, Bacillariophyceae y Pelagophyceae). En particular, se han encontrado en el picofitoplancton eucariota representantes de las clases Prasinophyceae (división Chlorophyta), Pelagophyceae (división Heterokontophyta) y Prymnesiophyceae, que son componentes mayoritarios en diferentes sistemas marinos [5].

La posibilidad de identificar especies por metodologías de la biología molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y la amplificación de las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican las subunidades pequeñas del RNA ribosomal (*RNAr 16S* para los procariotas y *RNAr 18S* para los eucariotas), significó un cambio sustancial en el estudio de la composición del pico y nanofitoplancton. Estas herramientas moleculares han permitido tanto la caracterización taxonómica como funcional y ha contribuido sustancialmente al entendimiento de la composición, interrelación, biodiversidad, distribución y abundancia a nivel global de los organismos más pequeños del fitoplancton [6]. Se ha reportado también que es posible realizar el análisis de filogenia molecular a partir de secuencias de genes cuyo estado evolutivo es suficientemente estable. Por ejemplo, para los eucariotas, se han usado los genes que codifican la subunidad pequeña del *RNAr* cloroplastídico (*RNAr 16S* plastídico), o la subunidad mayor de la RuBisCo (*rbcL*), y para los procariotas, el gen codificante de un factor de transcripción (*NtcA*) específico de cianobacterias [7, 8].





La gran mayoría de los estudios con metodologías de la biología molecular han sido realizados a partir de campañas oceánicas enmarcadas en proyectos globales de monitoreo de la diversidad del picofitoplancton en aguas marinas, como el PICODIV (<http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/PICODIV>) y de otras campañas que recopilan una gran cantidad de información proveniente del océano Atlántico Norte, del océano Pacífico, del océano Índico, del Mar Rojo y del Mar Mediterráneo [9, 11].

Sin embargo, hay regiones oceánicas inexploradas todavía, como las aguas del Océano Atlántico Sudoccidental [12], y en particular del Mar Argentino, que comprende más de tres millones de km² a lo largo de la costa de nuestro país [13]. La plataforma argentina constituye la continuación subacuática del continente, extendiéndose en una suave planicie que desciende hasta 200 m de profundidad, para luego precipitarse hasta los 5.000 m bajo el mar. La confluencia de las corrientes de Malvinas y Brasil, junto con la abundante escorrentía terrestre del Río de la Plata, y las aguas poco profundas de la zona, se combinan para producir un sistema hidrográfico singular. La principal característica de este sistema es que la plataforma y el talud continental constituyen unas de las áreas con mayor producción primaria, con valores de abundancia de fitoplancton aproximadamente tres veces mayor a la media registrada en el resto de los océanos [14]. Esta región, sustenta una variedad de especies de bivalvos bentónicos, peces, aves, mamíferos, y una considerable riqueza ictícola, que directa o indirectamente dependen de la abundancia del fitoplancton. La región también es importante en el balance regional del CO₂ [15].

Dada la importancia de la función que desempeñan los organismos del fitoplancton en el océano y la muy limitada información sobre los componentes de la fracción más pequeña en el Mar Argentino, se decidió comenzar un proyecto sobre esta temática, en una propuesta pionera, con la participación de expertos en áreas complementarias (fisiología y ecología marina, y bioquímica y biología molecular de microorganismos fotosintéticos) pertenecientes al Instituto de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP) y a la Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), a partir de un Convenio de Cooperación entre las dos Instituciones, firmado en mayo de 2001. En el presente capítulo se resumen los resultados obtenidos, usando metodologías moleculares, que dieron lugar a publicaciones y, hasta el presente, la concreción de dos tesis doctorales, en las que se estudiaron no sólo la biodiversidad de los componentes picofitoprocariotas y eucariotas del Mar Argentino, sino





también diferentes respuestas fisiológico-moleculares de organismos modelo (la cianobacteria *Synechococcus marinus* y la prasinofita *Ostreococcus tauri*) frente a variaciones de condiciones ambientales.

METODOLOGÍAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MARINA

La caracterización de la diversidad y las relaciones filogenéticas de los organismos procariotas y eucariotas pertenecientes a la fracción más pequeña del fitoplancton en aguas del talud patagónico y plataforma adyacente, se llevó a cabo mediante un enfoque metagenómico, en el que se usan técnicas moleculares. El proyecto se inició en colaboración con el INIDEP, cuyos investigadores, el Dr. Ricardo I. Silva y el Lic. Rubén Negri, estuvieron a cargo la colección de las muestras, determinación de parámetros ambientales y observaciones microscópicas. Los sitios de muestreo correspondieron a la campaña GEFII, Proyecto PNUD ARG 02/018 “Conservación de la Diversidad Biológica Marina y Prevención de la Contaminación en Patagonia” (Fig. 1).

Las muestras de agua fueron filtradas en forma diferencial para retener la fracción de organismos con un tamaño $< 3 \mu\text{m}$. Del material biológico de cada filtro, se extrajo el DNA ambiental del cual, posteriormente, se amplificaron fragmentos de los genes *RNAr 16S* y *18S* mediante la técnica de PCR, utilizando oligonucleótidos (cebadores) específicos para procariotas y eucariotas (tanto heterótrofos como autótrofos), respectivamente. En paralelo, se hicieron amplificaciones con oligonucleótidos específicos para amplificar genes presentes únicamente a la fracción fotosintética. Con los fragmentos producto de cada una de las amplificaciones por PCR, se generaron bibliotecas ambientales mantenidas en *Escherichia coli*. Como metodología complementaria para analizar la diversidad de picocianobacterias se utilizó la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Esta técnica permitió analizar la diversidad entre las muestras ambientales utilizando como referencia cepas aisladas del ambiente. Se procedió a secuenciar los fragmentos de DNA, tanto de las bibliotecas generadas como del DGGE, y los resultados fueron analizados en cuanto a su similitud mediante la comparación con secuencias presentes en bases de datos de dominio público. Esto permitió asignar las secuencias identificadas a diferentes grupos taxonómicos. Si bien este tipo de enfoque experimental es muy laborioso y demanda mucho tiempo en el laboratorio, resulta



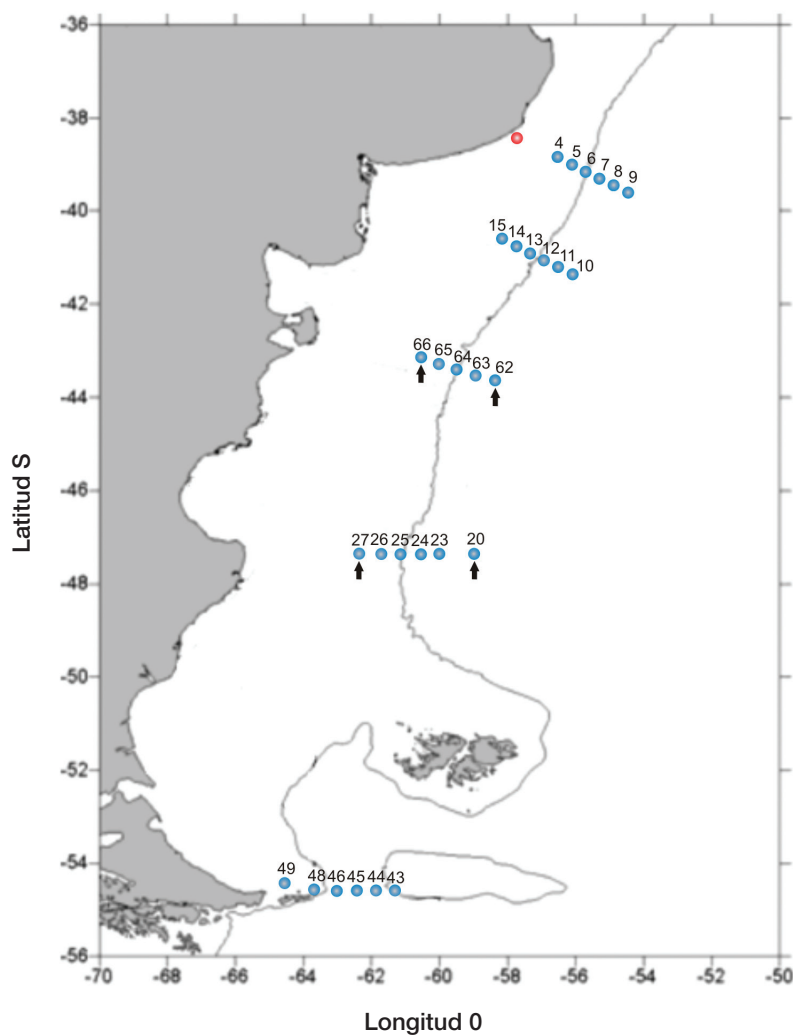


Figura 1. Sitios donde se realizaron las tomas de muestras en el Mar Argentino. El círculo rojo corresponde a la Estación Permanente de Estudios Ambientales (EPEA) las muestras fueron colectadas en una campaña del buque “Capitán Cánepa” (INIDEP). Los círculos celestes indican las posiciones de 29 estaciones donde se recogieron muestras en campañas del buque oceanográfico RV ARA “Puerto Deseado” (GEF II, PNUD ARG 02/018 Project). Las flechas señalan las muestras que han sido analizadas hasta el presente (estaciones 66, 27, 62 y 20).





ser extremadamente importante para un acercamiento inicial a las condiciones del ambiente, brindando un conocimiento más amplio de los componentes de cada muestra.

APORTES DE NUESTRO GRUPO DE INVESTIGACIÓN

El análisis de muestras de agua colectadas de la Estación Permanente de Estudios Ambientales (EPEA), situada frente a Mar del Plata demostró que la fracción procariota del picofitoplancton estuvo representada por cianobacterias del género *Synechococcus*, más precisamente del clado I. En las muestras correspondientes a las estaciones 20, 27 y 62 (Fig. 1) se identificaron secuencias de miembros del mismo clado. Sin embargo, un resultado muy interesante fue el hallazgo de secuencias de clado IV en las estaciones de la plataforma patagónica media (27 y 66) pero no en las estaciones de aguas oceánicas (20 y 62). La co-ocurrencia de *Synechococcus* de los clados I y IV ha sido bien documentada en otras regiones templadas mesotróficas (latitudes superiores 30 N / S). La abundancia de los dos clados es probable que varíe tanto espacial como temporalmente pero el hecho de la coexistencia sugiere que ambos clados están adaptados a aguas de baja temperatura y de alta concentración de nutrientes [16].

Para la realización del análisis de la fracción más pequeña del fitoplancton eucariota se hicieron bibliotecas genómicas ambientales, con dos estrategias experimentales diferentes.

En primer lugar se analizó cada una de las muestras utilizando cebadores generales con los cuales se determinó la presencia de los componentes fotosintéticos, como así también los heterotróficos, en las muestras estudiadas. Este análisis se realizó con el objeto de obtener una idea general de la estructura biológica de las muestras estudiadas. En este análisis, los microorganismos fotosintéticos pertenecientes a la fracción menor del plancton fotosintético fueron sensiblemente subestimados, determinándose la presencia de secuencias asociadas a haptofíceas, criptofíceas y pelagofíceas. En este estudio también se ha podido evidenciar un vasto número de linajes de estramenopilos marinos pertenecientes a la fracción pico-nano eucariota. Los denominados nuevos grupos de estramenopilos marinos incluyen hasta 12 linajes filogenéticos, aparte del grupo conocido como estramenopilos heterotróficos [9]. En todas las estaciones de muestreo analizadas se registraron secuencias asociadas a formas heterotróficas correspondientes a alveolados, cercozoa, apuzoa y katablephari-





dae. El análisis global de los resultados obtenidos en los diferentes puntos de muestreo, dio cuenta de una amplia diversidad, que concuerdan con estudios realizados en otros ambientes oceánicos [17].

En un segundo enfoque, se utilizaron cebadores específicos para determinar únicamente la fracción fotosintética, dado que era nuestra principal prioridad la identificación de los componentes autótrofos de las fracciones más pequeñas del plancton. Del análisis general de los componentes eucariotas más pequeños del plancton, se reveló la presencia de algunos de los principales grupos de pico-nano eucariotas con una abundancia relativa y diversidad variable entre los diferentes puntos de muestreo. Se logró una mayor representación de la fracción autotrófica, lográndose asociar secuencias a numerosas especies de eucariotes pertenecientes a las fracciones del pico y nanofitoplancton que no habían podido ser detectadas en las primeras bibliotecas. Entre las más representativas se ha determinado la presencia de secuencias asociadas a los géneros *Prasinoderma*, *Nephroselmis*, *Micromonas*, *Pyramimonas* y *Bathycoccus*, siendo géneros ampliamente distribuidos a escala global y de una importancia relevante en la fijación del carbono en los océanos [6].

Por otra parte, los estudios fisiológico-moleculares en los organismos modelos del picofitoplancton (*Synechococcus* sp. PCC 7002 y *O. tauri*), cuyos genomas han sido completamente secuenciados, permitieron conocer la respuesta de la picocianobacteria a cambios en la salinidad en cuanto a la acumulación de sacarosa (solute compatible), y a posibles mecanismos de respuesta de la prasinofita *O. tauri*, frente a variaciones de la concentración de nitrógeno en el medio.

PERSPECTIVAS FUTURAS

La necesidad de identificar las especies de particular relevancia (“key species”) en los ecosistemas oceánicos es un tema de importancia mundial. En el Mar Argentino es sumamente importante conocer los tipos funcionales de la comunidad del picofitoplancton no sólo en una serie temporal sino también en sus variaciones espaciales, ya que como se enfatizó previamente el Mar Argentino es una de las áreas biológicas más ricas de los océanos del mundo. Esto generará información sobre dinámicas de las poblaciones y como las actividades de sus componentes son afectadas estacionalmente, información que será fundamental para la evaluación de fenómenos a gran escala como el impacto del cambio climático global.





Dado que se han analizado sólo una parte de las muestras recolectadas en las campañas del Proyecto GEFII, se hará énfasis en conseguir nuevas fuentes de financiamiento para poder completar el estudio de las muestras recolectadas en todas las estaciones pertenecientes a las dos campañas, que servirá de punto de referencia y de comparación con los datos de futuras campañas. Los cambios en la estructura de la comunidad fitoplanctónica podrían proporcionar un alerta temprano para las perturbaciones generadas por el clima y otros factores en el Mar Argentino. Para contribuir a esta temática tan importante, apoyaremos la concreción de proyectos colaborativos con otros centros nacionales e internacionales y la realización de encuentros de intercambio multidisciplinarios, poniendo énfasis en promover la formación de recursos humanos en las disciplinas relacionadas.





REFERENCIAS

1. Doney SC, Ruckelshaus M, Duffy JE, Barry JP, Chan F, English CA, Galindo HM, Grebmeier JM, Hollowed AB, Knowlton N, Polovina J, Rabalais NN, Sydeman WJ y Talley LD (2012) Climate change impacts on marine ecosystems. *Annu Rev Mar Sci* 4(1):11-37.
2. Le Quéré C, Takahashi T, Buitenhuis ET, Rödenbeck C, Sutherland SC (2010) Impact of climate change and variability on the global oceanic sink of CO₂. *Global Biogeochem Cycles* 24(4):GB4007.
3. Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P (1998) Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281(5374):237-240.
4. Agawin NSR, Duarte CM, Agustí S (2000) Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnol Oceanogr* 45(3):591-600.
5. Moon-van der Staay SY, De Wachter R, Vault D (2001) Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature* 409(6820): 607-610.
6. Not F, Massana R, Latasa M (2005) Late summer community composition and abundance of photosynthetic picoeukaryotes in Norwegian and Barents Seas. *Limnol Oceanogr* 50(5):1677-1686.
7. Corredor J, Wawrik B, Paul J, Tran H, Kerkhof L, López J, Dieppa A, Cárdenas O (2004) Geochemical rate-RNA integration study: Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase gene transcription and photosynthetic capacity of planktonic photoautotrophs. *Appl Environ Microbiol* 70(9):5459-5468.
8. Penno S, Lindell D, Post AF (2006) Diversity of *Synechococcus* and *Prochlorococcus* populations determined from DNA sequences of the N-regulatory gene *ntcA*. *Environ Microbiol* 8(7):1200-1211.
9. Massana R, Balague V, Guillou G, Pedrós-Alió C (2004) Picoeukaryotic diversity in an oligotrophic coastal site studied by molecular and culturing approaches. *FEMS Microbiol Ecol* 50(3):231-243.
10. Viprey M, Guillou L, Ferréol M, Vault D (2008) Wide genetic diversity of picoplanktonic green algae (Chloroplastida) in the Mediterranean Sea uncovered by a phylum-biased PCR approach. *Environ Microbiol* 10(7):1804-1822.





11. Huang S, Wilhelm SW, Harvey HR, Taylor K, Jiao N, Chen F (2012) Novel lineages of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in the global oceans. *ISME J* 6(2):285-297.
12. Buitenhuis ET, Li WKW, Vaulot D, Lomas MW, Landry M, Partensky F, Karl DM, Ulloa O, Campbell L, Jacquet S, Lantoiné F, Chavez F, Macías D, Gosselin M, McManus GB (2012) Picophytoplankton biomass distribution in the global ocean. *Earth Syst Sci Data Discuss* 5:221-242.
13. Piola AR (2008) Oceanografía física. In: Estado de Conservación del Mar Patagónico y áreas de influencia 1-21.
14. Falabella V, Campagna C, Croxall J (Eds) (2009) Atlas del Mar Patagónico. Especies y Espacios. Buenos Aires, Wildlife Conservation Society y BirdLife International. <http://www.atlas-marpatagonico.org>.
15. Bianchi AA, Pino DR, Perlender HGI, Osiroff AP, Segura V, Lutz V, Clara ML, Balestrini CF, Piola AR (2009) Annual balance and seasonal variability of sea-air CO₂ fluxes in the Patagonia Sea: Their relationship with fronts and chlorophyll distribution. *J Geophys Res* 114(C3):C03018.
16. Pittera J, Humily F, Thorel M, Grulois D, Garczarek L, Six C (2014) Connecting thermal physiology and latitudinal niche partitioning in marine *Synechococcus*. *ISME J* 8(6):1221-1236.
17. Díez B, Pedrós-Alió C, Massana R (2001) Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit *rRNA* gene cloning and sequencing. *Appl Environ Microbiol* 67(7):2932-2941.







5:

BIOTECNOLOGÍA ALGAL







CAPÍTULO 13

Desarrollos de biotecnología algal como alternativa sustentable para la producción de biocombustibles y otros productos naturales

Mauro Do Nascimento, Lara Sanchez Rizza, Leonardo Curatti

Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (INBIOTEC-CONICET) y Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina
lcuratti@fiba.org.ar

RESUMEN

La biotecnología algal es una disciplina con un gran potencial como estrategia alternativa y/o complementaria para la producción de alimentos, biocombustibles y productos naturales destinados a la salud y cosmética.

En 2009 iniciamos un programa de bioprospección para el aislamiento y domesticación de especies de microalgas nativas del sudeste de Buenos Aires. A la fecha, la colección contiene más de 40 cepas caracterizadas por medio de metodología molecular, parámetros de crecimiento y requerimientos nutricionales. El análisis más detallado de la composición de la biomasa de las cepas más promisorias indicó potencial para la producción de biodiesel, bioetanol, ácidos grasos esenciales del tipo $\Omega 3$ y pigmentos de alto valor agregado.

Por otro lado, se han diseñado y optimizado sistemas de cultivo de microalgas a escala de laboratorio, incluyendo fotobiorreactores del tipo “air-lift”. Próximamente se instalarán piletas experimentales para el cultivo a cielo abierto y





fotobiorreactores ambientales, que son instrumentos de última generación para simular condiciones ambientales. Estos sistemas nos permitirán en el futuro inmediato poder completar nuestros estudios y realizar predicciones del rendimiento potencial de microalgas tanto en nuestra región como en cualquier otra.

Como investigación complementaria i) se aíslan, identifican y caracterizan bacterias promotoras del crecimiento algal; ii) se estudia la conversión de biomasa de unas cepas en otras para el desarrollo de biofertilizantes naturales y para el reciclado de nutrientes de la biomasa residual luego de la extracción de los productos de interés; y iii) se identifican y aíslan compuestos de alto valor agregado para la jerarquización, en términos productivos y económicos, de la biomasa algal. Otras líneas de investigación más recientes buscan contribuir al esclarecimiento de las bases genético-moleculares del control de la acumulación de aceites para futuros programas de mejoramiento por medio de la ingeniería genética de microalgas.

Las capacidades instaladas en el grupo, incluyendo la infraestructura y equipamiento, nos permiten asesorar y/o colaborar tanto con el sector público como el privado para el desarrollo conjunto de distintos emprendimientos de biotecnología algal. De hecho, se cuenta con un Servicio Tecnológico de Alto Nivel (STAN) del CONICET que ofrece entrenamiento personalizado en técnicas básicas de aislamiento, caracterización y cultivo de microalgas, como así también desarrollos *ad hoc* con distintas finalidades.

INTRODUCCIÓN

La crisis energética mundial demanda investigación y desarrollo (I & D) de tecnologías alternativas para la obtención de energía a partir de recursos renovables, con un mínimo impacto ambiental y bajo costo. Entre otras energías alternativas, la producción de agrobiocombustibles de primera generación como el biodiesel y el bioetanol que se producen a partir de cultivos oleaginosos o ricos en hidratos de carbono, respectivamente, tienen un gran potencial para cubrir parte de la demanda mundial de combustibles [1].

De manera similar a otros países, el Congreso de la Nación Argentina promulgó en 2006 la Ley Nacional de Biocombustibles (Ley N° 26093) que promueve la producción y uso de biocombustibles (bioetanol, biodiesel y biogás) en el país. La ley estableció que a partir de 2010 el combustible del tipo diésel comercializado en el país debería contener un 5 % de biodiesel y la nafta





un 5 % de bioetanol [2, 3]. Más recientemente, la sobreproducción de soja y cambios en los mercados internacionales permitieron un primer incremento del corte del diesel al 7 %, y luego al 10 % a fines de 2012. De esta manera en los últimos años Argentina se ha convertido en uno de los principales productores y exportadores de biodiesel del mundo. En cambio, en la actualidad el bioetanol que se produce en la Argentina proviene de la caña de azúcar y solo permite el corte de la nafta al 2-3 % en el noroeste argentino.

Los principales determinantes para la producción sustentable de agrobiocombustibles de primera generación son: 1) la disponibilidad en cantidad y calidad de las materias primas; 2) distorsiones en el mercado de alimentos primarios; y 3) efectos ambientales adversos colaterales [4].

Durante los últimos años se ha incrementado la I&D de múltiples estrategias para la obtención de materias primas alternativas para la producción de biocombustibles de segunda generación. Estos biocombustibles se producirían a partir de biomasa de cultivos no comestibles, de residuos lignocelulósicos de cultivos convencionales o cultivos energéticos seleccionados para tal fin, incluyendo microorganismos fotosintéticos como microalgas y/o cianobacterias [5]. Los biocombustibles de este tipo aún no están disponibles a escala comercial sino que se encuentran en plena etapa de I & D en todo el mundo [3]. El diseño de este tipo de biocombustibles avanzados implica una profundización del concepto de sustentabilidad y protección del medio ambiente en relación a sus antecesores que se comercializan en la actualidad [1].

El interés en el uso de microorganismos fotosintéticos como las microalgas y las cianobacterias como materia prima alternativa para la producción de biocombustibles de segunda generación se ha renovado sustancialmente durante la última década principalmente por su: 1) gran capacidad de producción de biomasa con tasas de crecimiento de hasta 1-3 duplicaciones por día, superando en gran medida la productividad de las plantas; 2) síntesis y acumulación de grandes cantidades (hasta más del 50% del peso seco) de lípidos neutros (microalgas) y/o hidratos de carbono (ambas); 3) posibilidad de ser cultivadas en tierras marginales (zonas áridas e incluso desiertos) que en general no son aprovechables para la agricultura tradicional ni otros usos alternativos; 4) posibilidad de manejo de la economía del agua dulce, uso de agua salada y reciclado de nutrientes a partir de aguas servidas y/o residuos industriales; y 5) posibilidad de obtención de co-productos novedosos con aplicaciones en alimentación, medicina y cosmética, entre otros [6].





Básicamente, se conciben dos modalidades principales para el cultivo masivo de microalgas y/o cianobacterias: piletones al aire libre (de los tipos “raceway ponds” o “round ponds”) o fotobiorreactores planos o tubulares. Comparativamente, el primer concepto permite productividades menores y menor control del bioproceso, pero demanda inversiones considerablemente menores y menor costo de operación y mantenimiento. La elección del sistema de producción de biomasa suele llevarse a cabo de acuerdo al valor agregado del bioproducto buscado: “raceway ponds” para alimentos y biocombustibles o fotobiorreactores para fármacos, nutracéuticos, pigmentos, etc. [1, 6].

Se presume que el desarrollo de tecnologías para la producción local de biomasa algal en biorefinerías destinadas a la producción de alimentos y biocombustibles de segunda generación al mismo tiempo que otros productos de mayor valor agregado podría tener un impacto positivo para el desarrollo de economías regionales basadas en las peculiaridades geográficas y socio-económicas particulares. Esto sería especialmente interesante en aquellas regiones que todavía no han podido participar de los beneficios del florecimiento de la industria de los biocombustibles de primera generación [3].

En la actualidad la biomasa algal solo se comercializa en relación a la obtención de bioproductos de alto valor agregado (principalmente astaxantina y otros carotenoides) ya que con la tecnología disponible aún no es rentable para la producción masiva de alimentos y/o biocombustibles. Por otro lado, las demostraciones experimentales de alcanzar las productividades potenciales anuales a gran escala son escasas e incompletas, generando incertidumbre sobre las posibilidades concretas de alcanzar el potencial de la biomasa algal como sustituto de la soja u otras materias primas provenientes de la agroindustria convencional. Parte de la dificultad reside en los niveles de inversión necesarios para montar plantas a nivel demostrativo en distintas latitudes y operarlas durante al menos un año en forma ininterrumpida [7].

En Latinoamérica en general y en Argentina en particular la I&D del uso potencial de biomasa algal para la producción de biocombustibles de última generación son incipientes [8].





CONTRIBUCIONES RECIENTES AL DESARROLLO LOCAL DE LA BIOTECNOLOGÍA ALGAL

En 2009 nuestro laboratorio ha comenzado un programa de bioprospección de cepas de microalgas y cianobacterias nativas del sudeste de la provincia de Buenos Aires con potencial biotecnológico. A la fecha se aislaron unas cuarenta cepas de Chlorophyta (algas verdes) y Cyanophyta (cianobacterias) luego de un procedimiento de enriquecimiento en cepas con mayor velocidad de crecimiento. La mayoría han sido identificadas por medio de taxonomía clásica y ribotipificación y se ha determinado la composición bioquímica porcentual de la biomasa de las mismas. En una primera fase se enfocaron los estudios a cepas oleaginosas como materia prima potencial para la obtención de biodiesel y se realizó un análisis detallado de la composición de ácidos grasos de los aceites de las cepas con niveles de acumulación de lípidos iguales o mayores al 30% de su biomasa seca. Se identificaron tres cepas que por su composición de ácidos grasos representarían una mejora sustancial de la calidad de la materia prima en relación al aceite de soja, como principal fuente de biodiesel en nuestro país. Aproximadamente un tercio de las cepas de la colección acumuló principalmente lípidos (Fig. 1), mientras que otro tercio acumuló hidratos de carbono hasta un 50 % de su peso seco, y el resto acumuló cantidades intermedias de ambos tipos de reservas carbonadas. Las cepas hiper-acumuladoras de hidratos de carbono representarían una materia prima alternativa para la producción de bioetanol por fermentación de la biomasa algal rica en azúcares y polisacáridos [8].

Las cepas más promisorias presentaron tiempos de duplicación de su biomasa de tan solo 8 h en condiciones controladas en cámaras de cultivo y de 24 h en condiciones de invernadero, sin control de las condiciones ambientales de luz y temperatura. Por extrapolación a datos similares a los anteriores (principalmente en condiciones de laboratorio), se ha sugerido que las microalgas tienen el potencial de proveer hasta 100 veces más materia prima para biodiesel (por unidad de área y tiempo) que, por ejemplo, la soja [9].

Nuestro laboratorio se interesa además, en la I&D de inoculantes bacterianos promotores del crecimiento algal [10]. Básicamente, se han aislado bacterias nativas promotoras del crecimiento algal [11] y bacterias diazotróficas mejoradas genéticamente para la nutrición nitrogenada de las algas a partir del aire [12, 13].



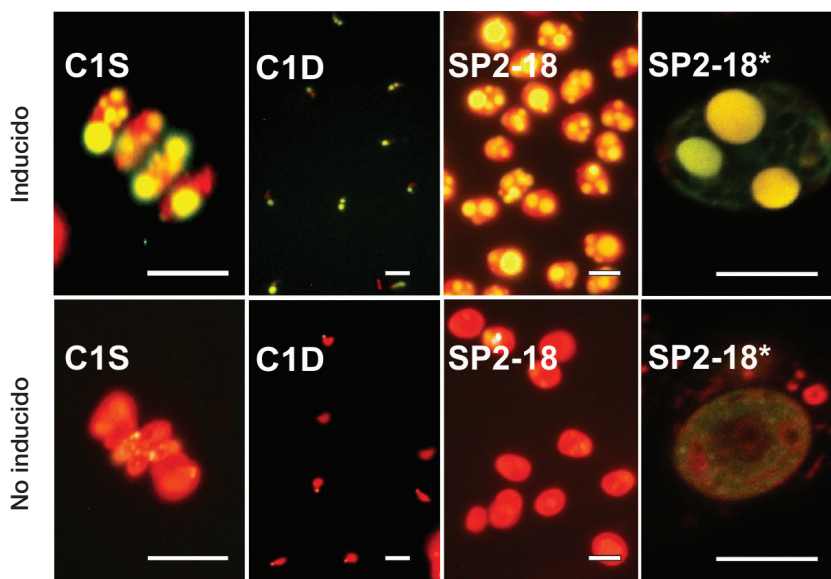


Figura 1. Observación microscópica de la acumulación de gotas de aceite en microalgas nativas. Las vesículas lipídicas fueron teñidas con el colorante Rojo de Nilo y visualizadas por microscopía de fluorescencia o de láser confocal (*). La inducción de la acumulación de lípidos se realizó por medio de un déficit de nitrógeno (0,5 mM NH_4^+). La fluorescencia amarilla corresponde a las vesículas lipídicas mientras que la roja corresponde a la autofluorescencia de la clorofila. La barra corresponde a 10 μm .

Con el fin de contribuir a incrementar la rentabilidad, y sobre todo la sustentabilidad, de posibles desarrollos de biotecnología algal para la obtención de biocomustibles, nuestro grupo se ha interesado en desarrollar el concepto de bacterias promotoras del crecimiento de algas. Recientemente hemos demostrado como una bacteria del género *Rhizobium* estimula el crecimiento de varias especies de microalgas, especialmente de una cepa del género *Ankistrodesmus* que produce cantidades importantes de aceites (hasta el 43% de su biomasa seca) como materia prima potencial para biodiesel y con un alto contenido de ácidos grasos esenciales del tipo $\Omega 3$ de gran demanda en los campos de la salud y nutrición [11].





En otros estudios se utilizaron bacterias fijadoras de nitrógeno modificadas genéticamente que introducidas en el cultivo de microalgas permiten la obtención de biomasa oleaginosa a expensas del nitrógeno del aire, lo que supone un ahorro sustancial en fertilizante nitrogenado [12, 13]. Con un propósito similar, se desarrolló un protocolo para la obtención de fertilizante nitrogenado líquido a partir de la biomasa de una cianobacteria nativa de nuestra región. Además de su calidad como biofertilizante para el cultivo de microalgas oleaginosas, la biomasa obtenida presentó contenidos excepcionalmente altos de ficobiliproteínas, que son pigmentos fluorescentes de alto valor agregado con aplicaciones en medicina, diagnóstico, alimentación e investigación. Hemos ajustado protocolos para la purificación de estas proteínas. Se espera que distintos desarrollos de este tipo puedan ser integrados en forma modular según el concepto de biorrefinería para incrementar la rentabilidad y sustentabilidad de los bioprocesos de biotecnología algal, especialmente aquellos dedicados a alimentación y bioenergía.

En forma paralela y como parte integral de la exploración del potencial de los recursos naturales nativos y su combinación en bioprocesos integrados nuestro laboratorio se interesa en la exploración y desarrollo de sistemas de cultivo y proyecciones de productividad a gran escala. Para esto hemos diseñado y optimizado sistemas de cultivo de microalgas a escala de laboratorio desde 1 ml hasta fotobiorreactores del tipo “air-lift” de 5-L acoplados a la suplementación con CO₂ (Fig. 2).

PERSPECTIVAS

En la actualidad y el futuro inmediato el grupo de trabajo se dispone a profundizar los estudios hacia posibles desarrollos locales de biotecnología algal.

Se ha diseñado una plataforma de piletas experimentales de hasta 100-L cada una para el cultivo a cielo abierto que será puesta en marcha en el corriente año. Además se cuenta con dos fotobiorreactores ambientales, que son instrumentos de última generación para simular condiciones ambientales. Estos sistemas nos permitirán en el futuro inmediato poder completar nuestros estudios y realizar predicciones del rendimiento potencial de microalgas tanto en nuestra región como en cualquier otra. Asimismo, estos sistemas permitirán estudiar la fisiología de la producción de biomasa algal en condiciones similares a las que experimentarían en piletas del tipo “raceway pond” para la produc-



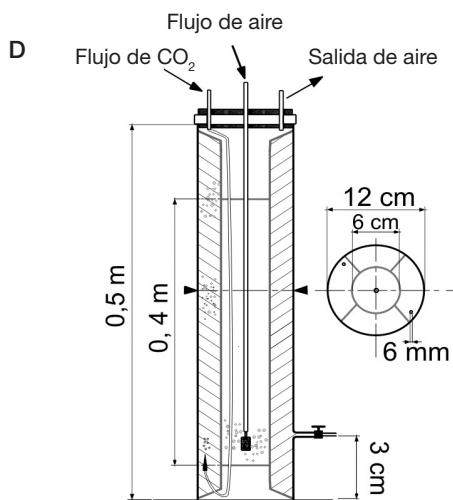
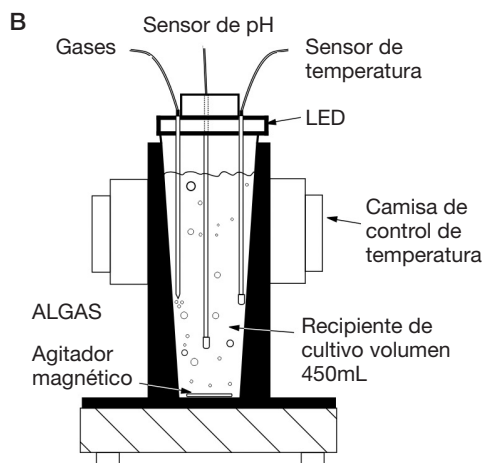
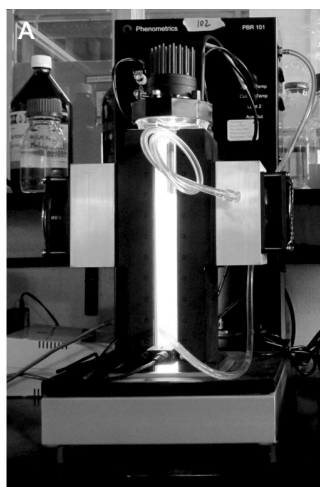


Figura 2. Sistemas de cultivo de microalgas. (A-B) Fotobiorreactor ambiental (ePBR) Phenometrics®. (A) Imagen, (B) esquema. La intensidad de luz es controlada mediante una lámpara de LED de luz blanca, la temperatura es controlada mediante una camisa de intercambio térmico, el sistema permite el control de pH, la suplementación de gases y el control de la turbidez por medio de un procesador. (C-D) Fotobiorreactor tipo "air-lift". (C) Imagen, (D) esquema. El flujo de aire, CO_2 y el medio de cultivo se establecen de modo que permita optimizar la mezcla de líquidos y gases. El aire filtrado se burbujea desde el fondo del cilindro interno, mientras que el CO_2 se burbujea desde el fondo del cilindro externo.





ción masiva de biomasa algal en una región geográfica y/o estación del año dadas. Se avanzará sobre la evaluación del rendimiento de las especies nativas más promisorias a escalas de cientos de litros y al modelado del rendimiento de un posible cultivo masivo en nuestra zona y distintas regiones geográficas del país. Se avanzará en estudios de bioconversión de la biomasa algal para la obtención de biocombustibles, la producción de fertilizantes orgánicos y el reciclado de la biomasa luego de la extracción de las materias primas para la obtención de biocombustibles. Se profundizará en la caracterización bioquímica de la biomasa de cepas selectas para la identificación de bioproductos de interés. Se realizarán estudios de biología molecular para investigar las bases genéticas del control de la acumulación de lípidos en microalgas.

OFERTA TECNOLÓGICA

Tanto el instrumental como la experiencia acumulada para el aislamiento, domesticación, identificación, mantenimiento, estudios fisiológicos y bioquímicos de la producción de biomasa y estudios de requerimientos nutricionales nos permiten brindar Servicios Tecnológicos de Alto Nivel.

En 2013 se colaboró con una empresa nacional para la capacitación de su personal en nuestras instalaciones y para una evaluación técnica y experimental de la factibilidad de adecuación de infraestructura/equipamiento para desarrollos relacionados con la biotecnología algal. El servicio de entrenamiento en técnicas básicas de biotecnología algal es apropiado para todo agente del sector público y/o privado que quiera iniciarse en este campo. Asimismo, se dispone de los medios y la experiencia para colaborar en forma multidisciplinaria en el diseño y puesta en marcha a escala de laboratorio (prueba de concepto) de bioprocesos integrados que involucren microalgas y otros microorganismos.





REFERENCIAS

1. Ragauskas AJ, et al. (2006) The path forward for biofuels and biomaterial. *Science* 311(5760):484-489.
2. Sorda G, et al. (2009) An overview of biofuel policies across the world. *Energ Policy* 38(11):6977-6988.
3. St. James C. (2009) La Argentina y los biocombustibles de segunda y tercera generación. Cámara Argentina de Energías Renovables. <http://www.cader.org.ar/>
4. Balat M, H Balat (2009) Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *App Energ* 86(11):2273-2282
5. Brennan L, Owende P (2010) Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energ Rev* 14(2):557-577.
6. Anemaet IG, et al. (2010) Algal photosynthesis as the primary driver for a sustainable development in energy, feed, and food production. *Mar Biotechnol* (NY) 12(6): 619-29.
7. Borowitzka MA (2013) Techno-economic modeling for biofuels from microalgae. *Algae biofuels energ* (Springer, Netherlands), pp 255-264.
8. Do Nascimento M, Ortiz-Márquez JCF, Sanchez-Rizza L, Echarte M, Curatti L (2012) Bioprospecting for fast growing and biomass characterization of oleaginous microalgae from south-eastern Buenos Aires, Argentina. *Bioresour Technol* 125:283-290.
9. Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25(3): 294-306.
10. Ortiz-Marquez JCF, Do Nascimento M, Zehr JP, Curatti L (2013) Genetic engineering of multi-species microbial cell-factories as an alternative for bioenergy production. *Trends Biotechnol* 31(9):521-529.
11. Do Nascimento M, Dublan MA, Ortiz-Márquez JCF, Curatti, L (2013) High lipid productivity of an *Ankistrodesmus-Rhizobium* artificial consortium. *Bioresour Technol* 146:400-407.
12. Ortiz-Marquez J.F, Do Nascimento M, Dublan MA, Curatti, L (2012) Association with an ammonium-excreting bacterium allows diazotrophic culture of oil-rich eukaryotic microalgae. *Appl Environ Microbiol* 78(7):2345.
13. Ortiz-Márquez JCF, Do Nascimento M, Curatti L (2014). Metabolic engineering of ammonium release for nitrogen-fixing multispecies microbial cell-factories. *Metabol Eng* 23:154-164.





CAPÍTULO 14

Fijación biológica del nitrógeno como estrategia alternativa a la producción industrial de fertilizantes nitrogenados

Juan César Federico Ortiz Marquez, Andrés Arruebarrena Di Palma,
Rafael Ambrosio, Joaquín Inchaurredo, Leonardo Curatti

Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología – Consejo Nacional
de Investigaciones Científicas y Técnicas (INBIOTEC-CONICET), Fundación para
Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
lcuratti@fiba.org.ar

RESUMEN

La creciente aplicación de fertilizantes nitrogenados es uno de los factores clave para responder a la demanda progresiva de alimentos a nivel mundial. La reciente diversificación de la agricultura para la producción de agrobiocombustibles ha incrementado la demanda de este insumo. El proceso industrial de Harber-Bosch constituye en la actualidad la principal fuente de fertilizantes nitrogenados y consume aproximadamente el 2% de la energía mundial. En contraposición con los beneficios que la síntesis química de fertilizantes ha representado para la Humanidad, su uso desmedido en los países más desarrollados y emergentes ocasiona una diversidad de efectos perjudiciales para el medioambiente. Por otra parte, los países menos desarrollados tienen acceso restringido a este insumo y sufren la baja productividad de sus cultivos.

El cultivo de microalgas representa una alternativa promisorio como complemento a la agricultura para la producción de alimentos, biocombustibles y biomateriales. Sin embargo, dado el alto contenido de nitrógeno de la biomasa





algal, su cultivo masivo representaría una práctica inviable si no se contemplan alternativas a la aplicación convencional de fertilizantes.

La fijación biológica del nitrógeno consiste en la biosíntesis de amonio a partir del nitrógeno del aire y representa una forma natural de fertilización nitrogenada. La aplicación de bioinoculantes conteniendo bacterias fijadoras de nitrógeno se viene utilizando exitosamente desde hace décadas en el cultivo de leguminosas. La gran especificidad de esta interacción planta-bacteria limita una mayor versatilidad de los inoculantes.

En nuestro laboratorio desarrollamos prototipos de inoculantes bacterianos de amplio espectro. La mayor parte de los mismos utilizan la bacteria modelo *Azotobacter vinelandii*, en la cual se combinan diferentes mutaciones por medio de herramientas de ingeniería genética que contribuyen a la desviación del flujo fisiológico del nitrógeno para optimizar la excreción de amonio como fertilizante nitrogenado de óptima calidad. Estas bacterias mutantes permitieron el reemplazo de una parte sustancial del fertilizante químico cuando fueron introducidas en el cultivo de microalgas hiperproductoras de aceite, como materia prima para biodiésel. En estos modelos de sistemas productivos, la energía necesaria para la fijación del nitrógeno proviene de productos de desecho ricos en energía que producen las microalgas, estableciéndose una estrecha relación funcional entre el cultivo y el inoculante.

Otro desarrollo del laboratorio consiste en la obtención de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, a bajo costo y procesamiento de biomasa, para la producción de un biofertilizante nitrogenado natural, el cual se demostró que mejora el rendimiento de biomasa algal en relación a los fertilizantes convencionales.

En el futuro inmediato el laboratorio se dispone a la optimización de estos inoculantes y a expandir su potencial campo de aplicación a otros cultivos, incluyendo plantas de interés agronómico.





INTRODUCCIÓN

Los fertilizantes nitrogenados en la agricultura

Los fertilizantes nitrogenados han tenido un gran impacto en la sociedad ya que han permitido incrementar la productividad agrícola en muchas regiones del mundo con un cambio relativamente pequeño de la superficie cultivada. Se ha estimado que entre el 40 y el 60% del rendimiento de los principales cultivos puede ser atribuido al uso de fertilizantes en climas templados e incluso superar el 90% al segundo año de raleado en suelos tropicales [1].

En la actualidad, a nivel global, se cree que cerca de la mitad de la población mundial puede ser alimentada gracias a la utilización de fertilizantes nitrogenados en los cultivos [2]. Contrariamente, en otras regiones del mundo como por ejemplo en África subsahariana, los rendimientos de los cultivos de los principales cereales continúan siendo magros debido al bajo uso de fertilizantes, entre otras cuestiones. En gran medida esto se debe a los elevados costos de exportación y transporte interno de estos insumos e incipiente desarrollo de la industria local, entre otras cuestiones de otra índole [3].

Los fertilizantes nitrogenados se obtienen principalmente por medio del proceso industrial de Haber-Bosch. En este proceso se mezclan el N_2 del aire con H_2 o metano en condiciones de muy alta temperatura y presión sobre un catalizador metálico para producir amonio/amoniaco o urea. La electricidad o gas natural necesarios para producir H_2 representan el 90% del costo de producción del fertilizante y hasta el 2% de la energía producida en el mundo [2].

El consumo de fertilizantes nitrogenados se ha incrementado en un 13% durante la última década y se anticipa que continuará incrementándose en un 2% en los próximos años [4].

El creciente uso de productos primarios de la agricultura para la producción masiva de biocombustibles de primera generación durante la última década ha profundizado la demanda de agroinsumos, en general, y de fertilizantes nitrogenados, en particular. En términos simplificados, el problema radica en que la crisis energética mundial debida al agotamiento de las reservas de combustibles fósiles obliga al desarrollo de fuentes alternativas de energía, que a su vez generen un menor impacto sobre el medio ambiente (principalmente sobre el efecto invernadero y el cambio climático global) [6].





Los biocombustibles de primera generación, básicamente bioetanol producido a partir de maíz o caña de azúcar y biodiésel a partir de aceites de soja, colza o palma, representaron una alternativa inmediata a este problema. Sin embargo, su explotación masiva en los términos actuales no representa una práctica sustentable a largo plazo, principalmente debido a la competencia por tierras fértiles con la agricultura tradicional dedicada a la nutrición, el incremento de la demanda de agroinsumos derivados del petróleo (por ejemplo los fertilizantes nitrogenados) y la capacidad limitada de reducir los niveles de emisión de gases causantes del efecto invernadero [6]. En tal sentido, cada vez más se asocia a la producción industrial masiva de fertilizantes nitrogenados y su utilización en la agricultura con efectos ambientales adversos tales como la eutrofización de cuerpos de agua, la contaminación de las napas de agua potable, y la alteración de la atmósfera relacionada con el cambio climático global, entre otros. Gran parte de esto se debe a la baja eficiencia del uso de nitrógeno por parte de los cereales que ha ido decreciendo durante las últimas décadas desde 80% en 1960 hasta 30% en 2000 para los principales cereales [3]. En gran medida, esto se debe a la falta de una implementación más generalizada de prácticas de agricultura de precisión. De esta manera, aproximadamente el 40% de los fertilizantes nitrogenados esparcidos en el ambiente es desnitrificado según un proceso metabólico llevado a cabo por bacterias del suelo que usa el nitrato como aceptor terminal de electrones y lo reduce (bajo ciertas condiciones específicas) hasta N_2 gaseoso. Si bien en principio este hecho no generaría efectos ambientales adversos en forma directa, el ciclo completo de síntesis de fertilizantes nitrogenados mediante el proceso de Haber-Bosch y su posterior de desnitrificación por procesos naturales (reversión completa del proceso) representa un desperdicio de energía que aproximadamente equivale al 1% de la energía utilizada globalmente. El resto del fertilizante no aprovechado por los cultivos permanece en ambientes terrestres, acuáticos, y en la atmósfera, ocasionando los efectos adversos antes mencionados [6].

La implementación de cultivos energéticos con características específicas para la producción de bioetanol y biodiésel de segunda generación a partir de tierras subóptimas o incluso no aptas para la agricultura tradicional permitiría resolver parte de los efectos adversos de los biocombustibles de primera generación.

Las microalgas representan una alternativa muy atractiva como cultivo energético para la producción de este tipo de biocombustibles avanzados. Es-





tos microorganismos fotosintéticos, habitualmente acuáticos y unicelulares, presentan una productividad potencial de hasta cien veces mayor a la soja y su cultivo es independiente de la fertilidad del suelo [7]. Sin embargo, en la actualidad, los costos de producción, no justifican su producción masiva para productos de bajo valor agregado como los biocombustibles [8].

Uno de los principales interrogantes es la elevada demanda de fertilizante nitrogenado necesario para lograr el potencial de rendimiento de las microalgas, lo que convertiría a su cultivo en una práctica considerablemente más nitrógeno-intensiva que la agricultura convencional. Dado que la biomasa seca de microalgas presenta un contenido de nitrógeno del 4-8%, se estima que se necesitarían aproximadamente 0,2 kg de urea para producir un 1 kg de triacilglicerol (materia prima directa para el biodiésel), o 2,5 ton/h/año para una producción continua en granjas acuáticas a la intemperie.

Fijación biológica del nitrógeno atmosférico como alternativa a los fertilizantes nitrogenados sintéticos

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN) es una parte esencial del ciclo el nitrógeno en el planeta y da cuenta de la producción de las dos terceras partes del nitrógeno biológicamente activo disponible para la gran mayoría formas de vida de la biosfera. Solo un grupo relativamente pequeño de microorganismos pertenecientes a Bacterias y Archeabacterias, conocidos como diazótrofos, presentan la capacidad de la FBN [9]. La FBN es un proceso que tiene lugar en condiciones anaeróbicas/micro-aeróbicas y solo excepcionalmente en condiciones aeróbicas, debido a la alta sensibilidad al oxígeno de las enzimas implicadas [3]. La FBN es llevada a cabo por las enzimas nitrogenasas que reducen el dinitrógeno del aire a amonio en una reacción que requiere 8 electrones y al menos 16 ATP por molécula de dinitrógeno fijado. La nitrogenasa más común es la nitrogenasa de hierro y molibdeno formada por las proteínas NifD y NifK (dinitrogenasa) y NifH (dinitrogenasa reductasa) como donador específico de electrones. Estas proteínas tienen varios centros metálicos, algunos de ellos en sus sitios catalíticos, que le confieren la característica sensibilidad al oxígeno [3].

Algunos organismos superiores (plantas y algas, por ejemplo) establecen relaciones del tipo simbióticas o mutualistas con bacterias diazotróficas que les permiten obtener nitrógeno del aire, aunque en forma indirecta, es de-





cir mediada por los microorganismos. La relación entre ciertas leguminosas y bacterias conocidas como rizobios se ha explotado con fines agronómicos con resultados satisfactorios durante las últimas décadas. Aunque con menor consistencia, también se han obtenido resultados exitosos en la inoculación de cereales con bacterias diazotróficas, que sin llegar a establecer una relación simbiótica formal con las plantas, colonizan el interior de las raíces y proveen productos de la FBN [10].

APORTES DE NUESTRO GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Investigación y desarrollo de biofertilizantes nitrogenados

Nuestro laboratorio se interesa en la investigación y desarrollo (I&D) de inoculantes bacterianos versátiles como biofertilizantes nitrogenados, con especial énfasis en el cultivo de microalgas, como campo de I&D de incipiente avance tanto en el país como en el mundo [11].

Hemos logrado aislar bacterias nativas promotoras del crecimiento algal, varias de ellas capaces de crecer diazotróficamente en condiciones micro-aeróbicas en medios de cultivo optimizados para tal fin. Sin embargo, en condiciones de cultivo que promueven el desarrollo algal (elevada tasa de fotosíntesis generadora de oxígeno) no hemos podido verificar que la inoculación con estas bacterias pudiera representar una fuente de nitrógeno biológicamente activo para las algas. En cambio, hemos propuesto que la promoción del crecimiento algal estaría mediada por hormonas del tipo vegetal (auxinas) y probablemente vitamina B12 producidas por la bacteria a cambio de productos de la fotosíntesis excretados por el alga. [12].

Siguiendo la hipótesis de una posible incompatibilidad entre la FBN y la fotosíntesis oxigénica [11], enfocamos nuestros estudios a dos de los casos excepcionales y paradigmáticos de FBN aeróbica: *A. vinelandii* y *Nostoc* spp.

Ingeniería genética del metabolismo del nitrógeno en *Azotobacter vinelandii*

A. vinelandii es una proteobacteria diazotrófica de vida libre comúnmente aislada del suelo que presenta la capacidad excepcional de FBN aún bajo concentraciones de oxígeno supra-ambientales. Se cree que esto se debe a una





multiplicidad de adaptaciones tales como una muy elevada tasa de respiración aeróbica a expensas de azúcares y la presencia de cubiertas celulares parcialmente impermeable al aire, entre otras [13]. De manera similar a otros diazotrofos de vida libre, *A. vinelandii* solo fija nitrógeno atmosférico para cubrir sus propios requerimientos y presenta un muy sofisticado sistema metabólico y genético para controlar sensiblemente la homeostasis celular del nitrógeno. La proteína NifL es uno de los principales sensores de los niveles celulares del nitrógeno fijado en forma de amonio que comunica esta señal a la proteína NifA que activa un centenar de genes que aumentan su expresión durante la FBN, en varias bacterias diazotróficas [14]. Hemos construido cepas mutantes de *A. vinelandii* con su gen *nifL* inactivado, que ya no pueden sentir el estado de suficiencia de nitrógeno fijado, continúan expresando los genes de la FBN y producen un exceso de amonio que liberan al medio circundante [15]. Estas bacterias mutantes presentan altos requerimientos energéticos y son menos eficientes en su crecimiento y producción de amonio en condiciones restrictivas de energía [16].

Con el objeto de continuar mejorando las posibles propiedades biofertilizantes de *A. vinelandii*, generamos cepas mutantes con un cambio en un aminoácido del sitio activo de la enzima glutamina sintetasa, las cuales presentan actividad reducida. Esta enzima es la encargada de sintetizar el aminoácido glutamina a partir de amonio y es el principal punto de convergencia del metabolismo del carbono y del nitrógeno. A partir de la glutamina (y el glutamato que se sintetiza a partir de la misma) se sintetizan el resto de las biomoléculas nitrogenadas de las células. De esta manera, estas cepas mutantes tienen una capacidad reducida de procesar el amonio producido por la FBN y lo liberan al medio extracelular y por otro lado presentan un menor requerimiento energético, menor consumo de azúcares y menor generación de biomasa bacteriana. La modificación genética a ambos niveles (disrupción de la homeostasis del nitrógeno celular y de la síntesis de aminoácidos) incrementó aditivamente la tasa inicial de excreción de amonio, sin embargo solo se verificaron incrementos transientes de esta propiedad junto con síntomas de disfunción celular severa [16].

Cuando se utilizaron estas cepas como bioinoculantes en el cultivo de una diversidad de microalgas oleaginosas, se observó que permitían cubrir los requerimientos de nitrógeno de las mismas hasta un nivel equivalente a 0,5 mM de amonio (Fig. 1). Como resultado de la inoculación pudo producirse aceite



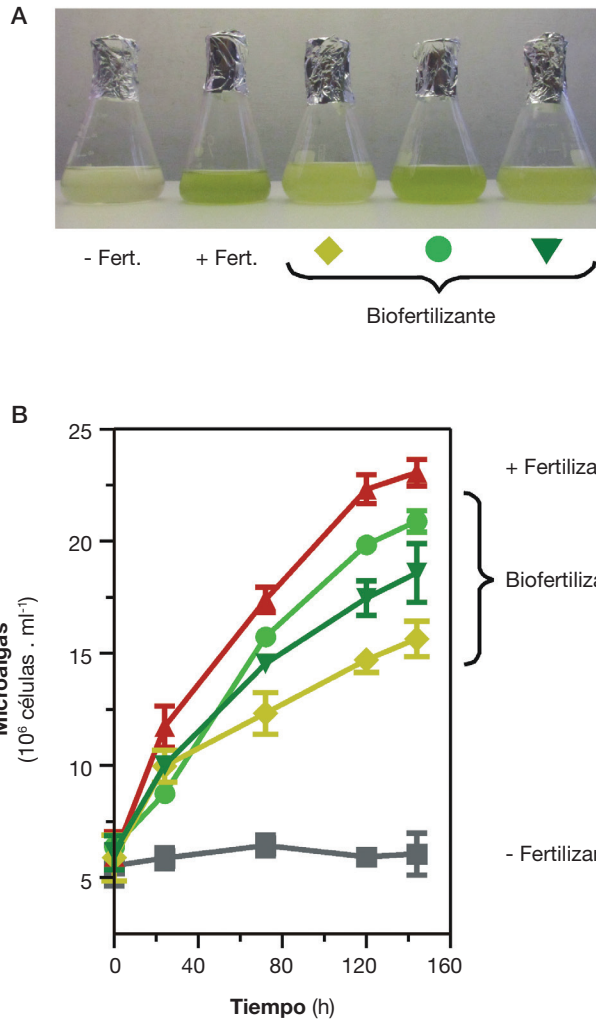


Figura 1. Los biofertilizantes nitrogenados permiten sustituir parte de los fertilizantes químicos durante el cultivo de microalgas.

(A) cultivos de microalgas *Chlorella sorokiniana* con o sin el agregado de fertilizante nitrogenado (NH_4^+) o con bacterias biofertilizantes. (B) curvas de crecimiento de *C. sorokiniana* en ausencia (\blacksquare) o presencia (\blacktriangle) de NH_4^+ o los biofertilizantes bacterianos *A. vinelandii* ΔnifL (\blacklozenge), *A. vinelandii* D49S (\bullet); o extracto de *Nostoc* sp. M2 (\blacktriangledown).



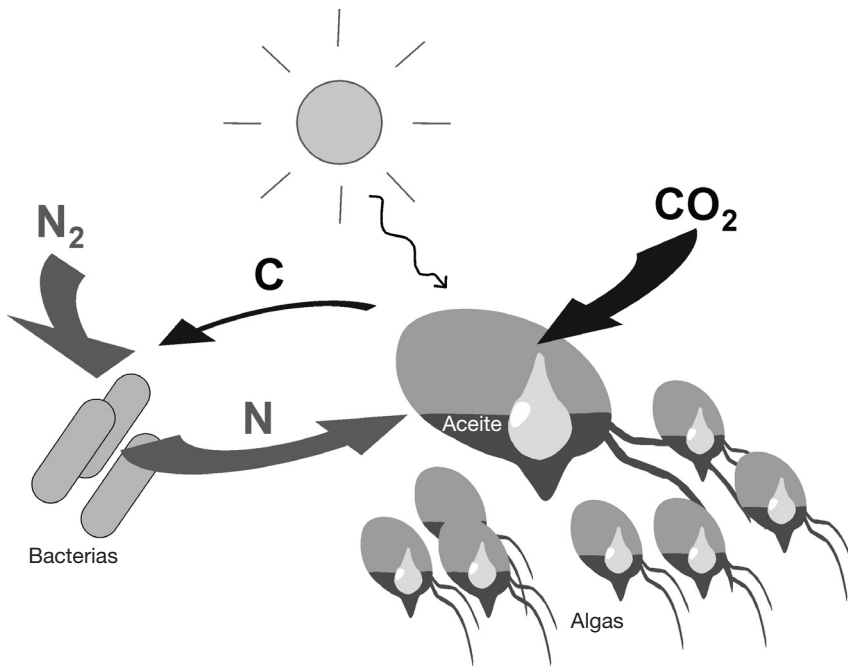


Figura 2. Esquema del intercambio carbono (C) – nitrógeno (N) entre microalgas y las bacterias biofertilizantes. La inoculación de microalgas con bacterias biofertilizantes permite la acumulación de biomasa algal rica en aceites (hasta el 50% de su masa seca) a expensas del carbono y el nitrógeno del aire y la energía solar.

algal (hasta el 50 % de la biomasa seca) a partir del carbono y del nitrógeno del aire. Se cree que en estos sistemas la microalga provee la energía necesaria para la FBN de la bacteria por medio de la excreción de productos fotosintéticos carbonados [15, 16] (Fig. 2).

Tecnología del uso de *Nostoc* spp. como biofertilizante nitrogenado

Nostoc spp. son cianobacterias filamentosas que realizan la FBN aeróbica por medio de células especializadas para tal fin. Mientras que las células vegetativas de los filamentos llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica y la asimilación del carbono, los heterocistos, que se diferencian a intervalos más o menos regulares





a lo largo de los filamentos de células vegetativas, pierden estas capacidades y en cambio llevan a cabo la FBN. De esta manera, el crecimiento armónico de los filamentos se sustenta en un intercambio de carbono por nitrógeno fijado entre ambos tipos celulares.

Nostoc sp. cepa M2 fue aislada en el sudeste de la provincia de Buenos Aires y en cultivo permite fijar unos 22 mg de nitrógeno del aire $\cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ bajo condiciones controladas de laboratorio y unos 15 mg $L^{-1} \cdot d^{-1}$ en fotobiorreactores tubulares a la intemperie en primavera/verano en la ciudad de Mar del Plata. Además de su gran capacidad de fijar nitrógeno del aire, esta cepa presenta otras propiedades de interés biotecnológico tales como: 1) crecimiento en forma de agregados laminares de filamentos, que facilitan notablemente su cosecha; y 2) fragilidad celular que permite obtener con facilidad preparaciones concentradas de su contenido celular con un contenido proteico (principal destino del nitrógeno fijado) del 50%. Estas preparaciones contienen además un complemento de enzimas hidrolíticas que degradan las proteínas hasta un tamaño accesible para una diversidad de microalgas. Estas preparaciones de proteínas de *Nostoc* sp. M2 pueden ser convertidas en proteínas de microalgas con una eficiencia que tiende al 100%.

Hemos observado también, en experimentos preliminares, que estas preparaciones podrían ser útiles como biofertilizantes para plantas.

Bacterias asociadas a microalgas como posible fuente de bioinoculantes nitrogenados para plantas

Durante nuestros estudios de bacterias asociadas a microalgas hemos notado que estas poblaciones suelen estar enriquecidas en géneros de bacterias comúnmente asociados a plantas tales como *Rhizobium* spp., *Herbaspirillum* spp. *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp, etc [12]. Esta observación motivó nuestro interés en estudiar las propiedades de biofertilizantes de algunas de ellas. En estudios preliminares hemos observado un efecto positivo de la inoculación de plantas de trigo con una cepa de *Herbaspirillum* spp. aislada de un cultivo de microalgas de nuestra zona en cultivos hidropónicos, en condiciones controladas, en cámaras de cultivo. Se observaron diferencias en el porcentaje de germinación, la elongación, contenido de clorofila y peso fresco foliares, y la elongación y peso fresco de las raíces. Estos efectos de la inoculación fueron considerablemente mayores en cultivos hidropónicos sin el agregado de una fuente de nitrógeno.





PERSPECTIVAS Y POSIBILIDADES DE INTERCAMBIO Y TRANSFERENCIA

Actualmente se continúan optimizando los inoculantes para microalgas como principal actividad de innovación de nuestro grupo. Se continuarán profundizando las líneas de investigación referidas a la ingeniería genética de *A. viennelandii* y a la tecnología del procesamiento de la biomasa de *Nostoc*. sp. M2. El primer caso representa un modelo de estudio fructífero para desafiar distintas hipótesis sobre la factibilidad de distintos desarrollos de ingeniería genética para la optimización de biofertilizantes nitrogenados. El segundo enfoque explora áreas de aplicación más concretas y está actualmente abocado a refinar los detalles de productividades de biomasa de la cepa M2 que podrían lograrse regionalmente en zonas aledañas a los posibles sitios de uso de los mismos, como así también a la posible formulación de estos preparados para optimizar su eficacia y estabilidad durante un posible almacenamiento. Nos interesa, además, conocer más detalles de las propiedades nutricionales y otros posibles factores promotores del crecimiento.

El desarrollo de bioinoculantes para plantas es una actividad ya bien establecida tanto en Argentina como el resto del mundo. Sin embargo, confiamos en que nuestro enfoque experimental mixto con algas y cianobacterias podría aportar una perspectiva alternativa interesante para el mejoramiento e innovación en el campo de los agroinsumos de última generación para una agricultura sustentable.





REFERENCIAS

1. Stewart WM, Roberts TL (2012) Food security and the role of fertilizer in supporting it. *Proc Eng* 46:76–82.
2. Erisman JW, Sutton MA, Galloway J, Klimont Z, Winiwarter W (2008) How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nat Geosci* 1:636–639.
3. Curatti L, & Rubio L M (2014) Challenges to develop nitrogen-fixing cereals by direct nif-gene transfer. *Plant Sci* 225:130–137.
4. Current world fertilizer trends and outlook to 2016 (2012) FAO, Rome, Avail-able online at <ftp://ftp.fao.org/ag/agp/docs/cwfto16.pdf>.
5. Tilman D *et al.* (2009) Beneficial biofuels—the food, energy, and environment trilemma. *Science* 325(5938):270.
6. Aneja VP, Schlesinger WH, Erisman JW (2008) Farming pollution. *Nat Geosci* 1(7):409–411.
7. Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25(3): 294–306.
8. Borowitzka MA (2013) Techno-economic modeling for biofuels from microalgae. *Algae for biofuels and energy*. Springer, Netherlands pp 255–264.
9. Dos Santos PC, Fang Z, Mason SW, Setubal JC, Dixon R (2012) Distribution of nitro-gen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes, *BMC Genomics* 13:162.
10. Zehr JP (2013) Interactions with partners are key for oceanic nitrogen-fixing-cyanobacteria: ocean-dwelling cyanobacteria associate with a variety of other-microorganisms, including those that are photosynthetic, *Microbe* 8:117–122.
11. Ortiz-Marquez JCF, Do Nascimento M, Zehr JP, Curatti L (2013) Genetic engineering of multispecies microbial cell factories as an alternative for bioenergy production. *Trends Biotechnol* 31(9):521–529.
12. Do Nascimento M, Dublan MDLA, Ortiz-Marquez JCF, Curatti L (2013) High lipid productivity of an *Ankistrodesmus*–*Rhizobium* artificial consortium. *Bioresource Technol* 146:400–407.
13. Setubal JC *et al* (2009) Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J Bacteriol* 191(14):4534–4545.
14. Sarkar A, Reinhold-Hure KB (2014) Transcriptional profiling of nitrogen fixation and the role of NifA in the diazotrophic endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *PloS One* 9(2):e86527.





15. Ortiz-Marquez JCF, Do Nascimento M, de los Angeles Dublan M, Curatti L (2012) Association with an ammonium-excreting bacterium allows diazotrophic culture of oil-rich eukaryotic microalgae *Appl Environ Microbiol* 78(7):2345-2352.
16. Ortiz-Marquez JCF, Do Nascimento M, Curatti L (2014) Metabolic engineering of ammonium release for nitrogen-fixing multispecies microbial cell-factories. *Metab Eng* 23:154-164.

